



Détermination de la pollution atmosphérique métallique : étude critique de l'utilisation des écorces d'arbres

Mickaël Catinon

► To cite this version:

Mickaël Catinon. Détermination de la pollution atmosphérique métallique : étude critique de l'utilisation des écorces d'arbres. Océan, Atmosphère. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010. Français. NNT : . tel-00554894

HAL Id: tel-00554894

<https://theses.hal.science/tel-00554894>

Submitted on 11 Jan 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement

Détermination de la pollution atmosphérique métallique : étude critique de l'utilisation des écorces d'arbres

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 22 janvier 2010
pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Grenoble 1

par

Mickaël CATINON

Dirigé par Patrick RAVANEL (directeur) et Sophie AYRAULT (co-directrice)

Composition du Jury

Rapporteurs : M. G. Blake

Mme M. C. Freitas

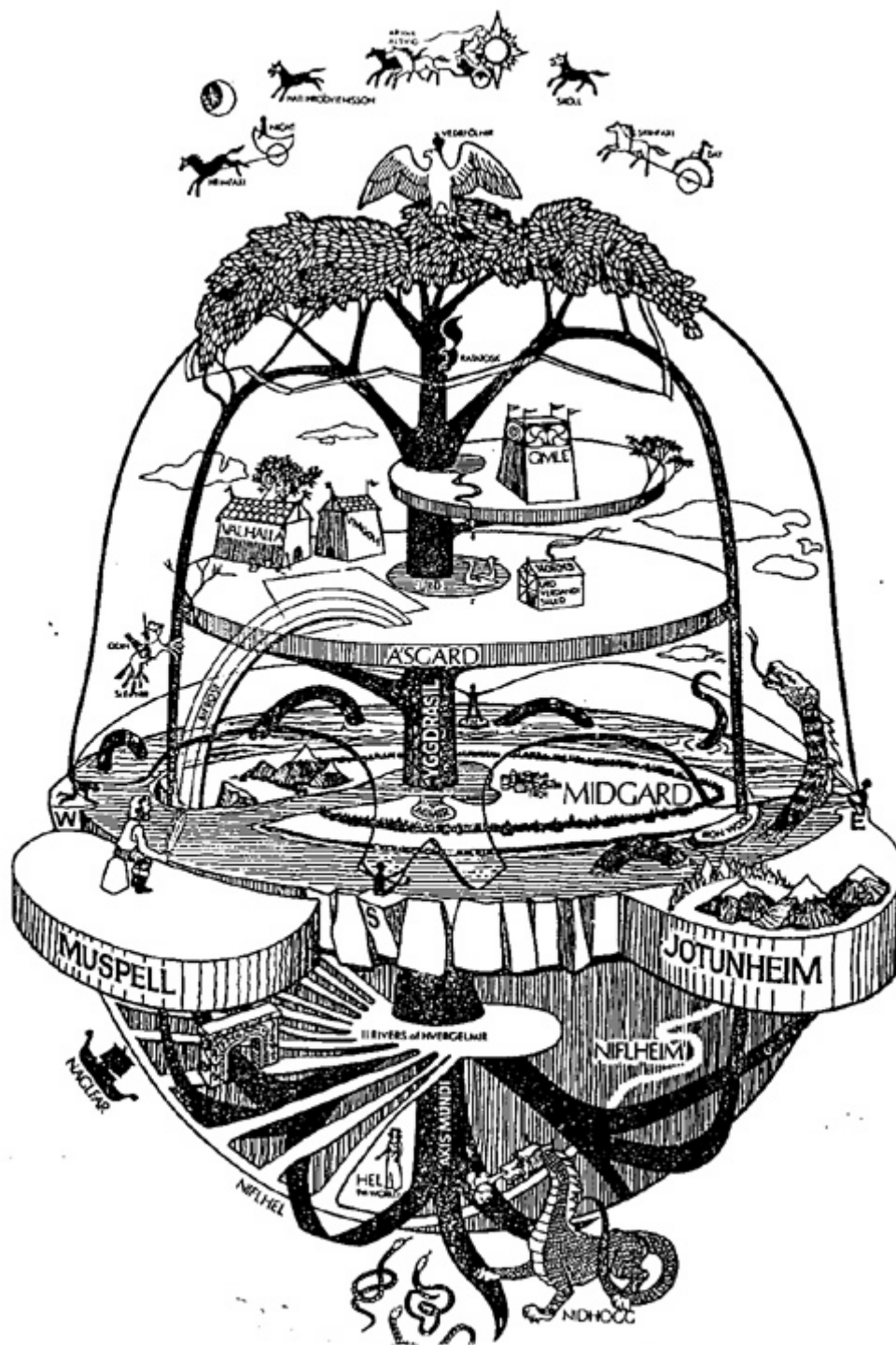
Examineurs : Mme S. Ayrault (co-directrice de thèse)

M. J.L. Jaffrezo

Mme M.B. Personnaz

M. P. Ravanel (directeur de thèse)

Mme I. Till (présidente du jury)



Le frêne Yggdrasil était le support de l'univers. Selon la mythologie scandinave, ses branches soutenaient les neuf mondes, qui se divisaient en trois grandes zones (de la plus élevée à la plus basse).

Titre : Détermination de la pollution atmosphérique métallique : étude critique de l'utilisation des écorces d'arbres.

Résumé : L'atmosphère terrestre est le siège d'un transport de matière, en particulier d'éléments d'origines diverses, dont une proportion importante résulte des activités humaines. Ce phénomène induit des conséquences parfois graves, pour la santé humaine et pour la fonctionnalité des écosystèmes. Les éléments ainsi transférés sont redéposés, de manière complexe, à la surface de la terre, avec une cartographie de distribution très inégale, des possibilités d'accumulation, ou au contraire de dilution, variables, conduisant à des altérations diversifiées de la composition des eaux et des sols et de la fonctionnalité des êtres vivants. La redéposition atmosphérique est étudiée depuis une cinquantaine d'année sur les troncs des arbres, qui constituent une matrice verticale commune, très enrichie par l'apport atmosphérique, et pouvant mener soit à une analyse de composition, soit à des études de bioindication. Il en a découlé des tests de routine largement utilisés. Cependant, pour définir avec précision les apports d'origine anthropique et mieux maîtriser, en vue de les réduire, les apports anormaux ou dangereux, une étude en profondeur de cette déposition corticale devait être entreprise. C'est l'objet de ce mémoire.

Au regard de la complexité du problème abordé, nous nous sommes essentiellement limité à l'étude d'une seule espèce d'arbre : *Fraxinus excelsior* L., très commun dans notre zone d'étude et couvrant une vaste échelle d'altitude. Notre démarche analytique a consisté à combiner une analyse élémentaire très complète et sensible, l'ICP-MS avec une observation en microscopie à balayage couplée à la détermination de l'émission de rayons X spécifique des éléments présents. Cet ensemble de deux méthodes a permis de combiner identification - dosage précis - localisation - distinction entre états particulaire et dispersé. La déposition atmosphérique a été considérée sur une échelle de temps allant de 3 mois à 40 ans, en séparant les pousses successives des arbres. Nous avons séparé le dépôt superficiel sur les surfaces végétales d'une fraction solidement intégrée dans les tissus des tiges, spécialement le suber. Ces deux entités ne correspondent pas à la même chronologie. Nous avons montré que le dépôt de surface était, de fait, un écosystème construit sur un biotope alimenté conjointement par l'atmosphère et par l'arbre lui-même et qu'il comportait une phase vivante reviviscente et pour partie photosynthétique. Ce dépôt superficiel est déplacé en grande partie par la pluie. Le suber, couche apoplastique imperméable, a une bonne capacité de rétention des éléments à long terme et constitue, comparativement aux autres tissus des tiges, une matrice très intéressante pour percevoir l'apport atmosphérique sur plusieurs décennies. Pour déterminer valablement les apports atmosphériques d'origine anthropique qui s'accumulaient dans ces deux types de matrices, nous avons conçu un système de calcul (AAEF) permettant de les séparer des apports géogéniques et biologiques. Par ailleurs, constatant que l'apport atmosphérique comportait deux types de constituants, soit dispersés, soit particuliers, nous avons conçu et mis en œuvre un protocole de fractionnement basé 1) sur l'incinération, 2) sur les traitements successifs à l'eau et à l'acide nitrique concentré (2N) qui nous a permis d'étudier isolément une phase particulaire dans laquelle la masse des matériaux géogéniques se trouve rassemblée avec l'essentiel du plomb et du manganèse, la phase HNO₃ concentrant les éléments comme le cuivre et le zinc et une phase H₂O contenant l'essentiel du potassium. Les profils de distribution entre les différentes fractions semblent constituer une information intéressante sur la spéciation de plusieurs types d'éléments. L'ensemble du corpus méthodologique ainsi édifié permet d'accéder à des études assez réalistes d'historique et de distribution géographique des polluants élémentaires à des échelles de distances variées.

Mots clés : écorce d'arbres, pollution atmosphérique, métaux lourds, biosurveillance, bioaccumulation, AAEF, ICP-MS, SEM-EDX, PIXE.

Title: The deposit of atmospheric polluting elements: a critical study of the deposit on tree barks as a tool for biomonitoring.

Abstract: Human activities are responsible for the atmospheric transfer of several types of compounds among which elements are present. One of the secondary effects of such transfer may be to affect human health and the functionality of ecosystems. After atmospheric transfer, a complex deposition of the elements occurs on the earth surface, with very unequal distribution, accumulation or dilution inducing quite different effects on water and soil composition and on the functionalities of living beings. The deposition process has been studied for approximately half a century on tree trunks. These organs constitute a very common vertical matrix on which quantitative or biomonitoring studies can be efficiently carried out, thus offering widely used routine tests. However, for a better exploitation of the information contained in such deposits, a much better understanding of this type of deposition was required. Such is the purpose of this report.

A single tree species was chosen for this study: *Fraxinus excelsior* L., a very common tree for our region, which was cultivated in the campus station and which could be found at several altitudes between 200 and 1700 m. Our methodological approach consisted in mixing two types of analytical techniques: ICP-MS and SEM-EDX which allowed to obtain an accurate concentration measurement of trace elements, a determination of their location or distribution at a microscopic scale and a chemical determination of the composition of crystallized or precipitated compounds. The time-scale of our studies on deposits ranged from 3 months to 40 years. Two types of fractions were analyzed separately: a superficial one, on the stems, and another one, integrated inside the suber tissue and also inside other tissues. It was demonstrated that the superficial deposit was in fact a component of a specific small ecosystem characterized by a non-negligible photosynthetic rate and by a reviviscent ability. The superficial deposit is submitted to a partial lixiviation by rain. The suber tissue is a waterproof, apoplastic layer able to tightly retain most of the elements over long periods of time. It seems to be the best tissue for retaining atmospheric components over several decades. The deposit has several possible origins geogenic, biogenic or anthropogenic. In order to focus on this last fraction, a new system of calculation was conceived, which allows to determine the composition of an atmospheric anthropic elements fraction (AAEF). Moreover, this AAEF was fractionated into two parts, a dispersed one inside the deposit and a pattern of solid particles which were found either in the superficial deposit or inside the suber but not in the other tissues. A purification of the solid particles fraction was carried out, separating the water-soluble elements, the HNO₃ 2N-soluble ones and the solid residue. This last fraction contains most of the geogenic components, and of the Pb and Mn contents. The HNO₃ fraction concentrates the elements such as Zn and Cu. The main purification steps are associated to the presence of the whole stock of dispersed K and Na inside the water phase and of Ca in the HNO₃ fraction. This fractionation probably allows interesting speciation studies. With all this new experimental approaches, it seems possible to obtain realistic analyses of the historical and geographical distributions of elements deposits on different spatial scales.

Keywords: tree barks, air pollution, heavy metals, biomonitor, bioaccumulation, AAEF, ICP-MS, SEM-EDX, PIXE.

Remerciements

En préambule de ce mémoire, je souhaiterais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apportés leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce travail de thèse ainsi qu'à la réussite de cette formidable expérience qu'est le doctorat.

En premier lieu, je tiens à remercier chaleureusement mes deux directeurs de thèse Sophie Ayrault et Patrick Ravanel.

Merci, Sophie, d'avoir toujours pris le temps de m'encadrer, me conseiller et m'aider malgré les 500 km qui nous sépare. L'impressionnante liste des mails que nous avons échangés en témoigne. Merci aussi pour les nombreuses analyses élémentaires que tu as fait pour nous qui, je le sais, sont coûteuses en temps et en matériel. J'ai toujours été impressionné par ton efficacité et ton professionnalisme, tu es et resteras pour moi un exemple à suivre.

Merci, Patrick, de m'avoir permis d'intégrer ton équipe dès le master 1 et de m'avoir toujours soutenu par la suite. Ton charisme, tes conseils et ton expérience dans l'encadrement m'ont permis de réaliser ma thèse sereinement. T'avoir comme directeur aura été pour moi une chance et un honneur dont je suis très fière.

Mes remerciements vont également aux membres du jury Maria Carmo Fretas et Gérard Blake qui ont acceptés la tâche d'être rapporteurs du manuscrit et Sophie Ayrault, Jean Luc Jaffrezo, Marie Blanche Personnaz, Patrick Ravanel et Irène Till d'avoir accepté d'examiner ce travail.

C'est avec grand plaisir que j'ai vu Irène Till, avec qui j'ai commencé à travailler en Master 1 avec le TP "trèfle", accepter la présidence de mon jury de thèse.

Mon sujet aura peut être été un peu atypique dans le laboratoire et l'équipe, mais j'ai eu l'énorme avantage d'avoir un "binôme" de luxe : le professeur Michel Tissut, chercheur bénévole passionné et surdoué de la recherche. Sans toi, cette thèse n'aurait pas vu le jour et je t'en remercie. Grace à tes remarquables qualités humaines qui font l'unanimité au laboratoire, nous avons toujours allié travaillé et bonne humeur et avec toi les parties de rigolades sont quotidiennes. Je me souviendrais longtemps toi et Bilbo avec la "laisse ficelle" et de nos sorties champignons improvisées.

Un grand merci à Juliette Asta, chercheur bénévole spécialisée dans l'étude des lichens pour son aide, sa générosité et pour l'intérêt qu'elle a porté à mon sujet depuis le début et sur qui j'ai pu compter tout au long de ma thèse.

Merci à Pierre Taberlet de m'avoir accueilli dans son laboratoire et merci à l'ensemble du LECA qui est un laboratoire de qualité avec une convivialité et une bonne humeur tout à fait exceptionnelle. Je remercie en particulier l'équipe PEX grâce à qui mon expérience professionnelle aura aussi été une grande expérience humaine !

Merci à Grégory Agnello, chargé de projet dans le bureau d'étude EVINERUDE, qui a du boulot par-dessus la tête et qui trouve quand même le temps de travailler avec nous sur différents contrats. C'est d'ailleurs avec grand plaisir que je continuerais nos travaux communs après ma thèse.

Un grand merci à Anne-Laure Tissut pour ses "corrections éclaircies" de l'anglais de nos articles qui nous ont fait gagner un temps précieux.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Omar Boudouma, Jean Paul Gallien, Roberto Clocchiatti et Sophie Ayrault qui m'ont transmis tant de connaissances et de compétences au niveau des analyses physico-chimiques (SEM-EDX, PIXE et ICP-MS). Je remercie Lucile sage pour m'avoir permis de faire des photos de microscopie optique. Je remercie également l'ensemble du personnel technique du LECA et en particulier Joelle Patouraux, Geneviève Girard et Thierry Gaude pour leur aide précieuse.

Je remercie les membres de mes comités de thèse : Juliette Asta, Sophie Ayrault, Arnaud Callec, Claire Chappaz, Géraldine Guillaud, Jean Luc Jaffrezo, Patrick Ravanel et Michel Tissut qui ont permis, grâce à une vision extérieure, d'apporter des idées nouvelles sur mes travaux.

Merci à Marie Blanche Personnaz, Géraldine Guillaud, Claire Chappaz et l'ensemble de l'ASCOPARG pour leur collaboration dans mes travaux.

Merci à Jean Luc Jaffrezo pour sa collaboration et son aide.

Je remercie toutes les personnes qui ont pu faciliter de près ou de loin ma vie au laboratoire : Olivier Lontin pour la maintenance de mon PC qui en avait bien besoin, l'ensemble du secrétariat : Jérôme Rupied, Joceline Visconti, Joelle Claustre, Kim Pla, Florence Sagnimorte, Gwenaëlle Clément, Caroline Messina Dos Santos et Aude Martinez. Cette aide fut plus qu'appréciable.

Merci à François Guichard et Sophie Ayrault pour m'avoir grandement aidé lors de mes séjours au CEA de Saclay et au LSCE dont je remercie les membres pour leur accueil et leur bonne humeur.

Merci à mon unique stagiaire, Céline Esprit, qui m'a prêté main forte et qui m'a initié à l'encadrement. J'ai été très satisfait de ton travail et te souhaite tous mes vœux de réussite pour la suite de tes études.

Comment ne pas remercier mes amis proches thésards et stagiaires avec qui j'ai partagé d'excellents moments aussi bien au laboratoire qu'en dehors ? Merci à Angélique que je connais depuis mon arrivée à Grenoble, la joie et la bonne humeur ne t'ont jamais quitté et tu es un peu notre rayon de soleil ! Merci à Özgür, binôme du master 1 et collègue de bureau depuis toujours et j'en suis très content ! Merci à Claire avec qui je me suis trouvé une passion commune pour les jeux de sociétés, à Aurélien excellent équipier de notre équipe de foot passé dans le camp ennemi depuis peu, à Guillaume un des rares clients de mes blagues improvisées et avec qui je partage de grands moments de rigolade, à Fabien qu'on regrette bien depuis qu'il est parti à Nancy, à Rodolphe alias "gentil Rodolphe" toujours de bonne humeur, à Thomas le taekwondoïste du groupe et shaolin soccer à ses heures, à Tarafa notre syrien national, à Emma la stagiaire idéale que tout le monde s'arrache, à Marie Audrey supportrice officielle de notre équipe de foot et à Matthieu qui met la bonne ambiance dans nos soirées. Je remercie aussi tous les thésards post-doc avec qui j'ai partagé mon quotidien : Abdé, Alice, Anthony, Asam, Bahar, Bénédicte, Bruno, Carole, Cécile, Charlène, Christina, Claire, David, Fabrice, Flore, Francesco, Guillaume, Jérôme, Jonathan, Julien, Romain, Rourou, Isabelle, Laure, Lucie, Marco, Margot, Marie, Mathieu, Nicolas, Olivier, Patrick,

Sébastien, Sophie, Tamara, Vinciane, ... Je vous remercie tous, Et les autres, pardonnez moi si je vous oublie ! Vous avez été et serez toujours un concentré de bonne humeur et de grandes parties de rigolade !

Merci aux potes footaux du LECA : Abdé, Özgür, Tarafa, Bruno, Romain, Julien, Guillaume, Aurélien, Olivier, Mathieu, Fransesco, Margot, Saeid, Rourou, Sébastien... Pour les innombrables parties qui m'ont permis de toujours garder la forme !

En dehors du laboratoire il existe une autre vie avec encore plein d'autres amis ! Je pense tout d'abord à mes colocataires, Yoann et Alexis qui partagent mon quotidien et que je remercie. Merci aux anciens voisins de la résidence Berlioz : Jimmy, Karim, Ivan, Sophie, Wolfram, Arnaud, Aurélie, Céline, Marc, Mathis, Mathieu, Nicolas, Virginie. Puis merci à tous ceux que j'ai côtoyé pendant ma thèse : Kévin, Céline, Ben, Aurélie, Grégory, Sandra, Emilie, Gillou,

Et puis bien sûr je remercie ma famille. C'est avec le cœur lourd que je remercie ma maman qui me manque terriblement, elle m'aura toujours soutenu dans mes études, soutien qui m'aura fait moralement énormément de bien... Je remercie aussi mon père, mon frère et ma sœur pour leur soutien inconditionnel et leur patience ainsi que le reste de ma famille pour leur bonne humeur et leur soutien.

Liste des abréviations

AAEF	A nthropic A tmospheric E lements F raction
AASQA	A ssociations A gréées pour la S urveillance de la Q ualité de l' A ir
ADEME	A gence de l' E nvironnement et de la M aîtrise de l' E nergie
AGF	A tmospheric G eogenic F raction
AMPASEL	A ssociation de M esure de la P ollution A tmosphérique de Saint E tienne et du département de la L oire
ASCOPARG	A ssociation pour le C ONtrôle et la P réservation de l' A ir en R égion G renobloise
CATAENAT	C harge A cide T otale d'origine A tmosphérique dans les E cosystèmes N ATUREls T errestres
CET	C ontenu E lémentaire T otal
CITEPA	C entre I nterprofessionnel T echnique d' E tudes de la P ollution A tmosphérique
CM	C ontenu M inéral
CNRS	C entre N ational de la R echerche S cientifique
COPARLY	C omité pour le C ontrôle de la P ollution A tmosphérique dans le R hône et la région L Yonnaise
COV	C omposés O rganiques V olatils
DRE	D irection R égionale de l' E quipement
DREAL	D irection R égionale de l' E nvironnement, de l' A ménagement et du L ogement
DIREN	D irection R égionale de l' E Nvironnement
DRIRE	D irections R égionales de l' I ndustrie, de la R echerche et de l' E nvironnement
EDX	E nergy D ispersiv X -ray
EF	E nrichment F actor
EMEP	E uropean M onitoring and E valuation P rogramme
ENS	E space N aturel S ensible
ETM	E léments T races M étalliques
GNV	G az N aturel pour V éhicules
GPL	G az de P étrole L iquéfié
HAP	H ydrocarbure A romatique P olycyclique

ICP-MS	I nductively C oupled P lasma- M ass S pectrometry
INERIS	I nstitut N ational de l'Environnement industriel et des RIS ques
INRS	I nstitut N ational de R echerche et de S écurité
IPPC	I ntegrated P ollution P revention and C ontrol
IRIS	I nfra R ed I maging S pectroscopy
LAURE	L oi sur l' A ir et l' U tilisation R ationnelle de l' E nergie
LECA	L aboratoire d' E Cologie A lpine
LNE	L aboratoire N ational de métrologie et d' E ssais
MEB	M icroscope E lectronique à B alayage
MERA	M Esure des R etombées A tmosphériques
MM	M asse M inérale ; M ineral M atter
MO	M atière O rganique
MS	M asse S èche
OM	O rganic M atter
OSPAR	convention OS lo PAR is
PCB	P oly C hloro B iphényles
PCP	P enta C hloro P henol
PDU	P lan de D éplacement U rbain
PIXE	P roton I nduced X -ray E mission
PM	P article M atter
POP	P olluants O rganiques P ersistants
POVA	P OLLution des V allées A lpines
PPA	P lan de P rotection de l' A tmosphère
PRQA	P lan R égional de Q ualité de l' A ir
PTFE	P oly T etra F luoro E thylene
RENECOFOR	R Eseau N ational de suivi à long terme des E COsystèmes F ORestiers
rpm	rotation p ar m inute
SARM	S ervice d' A nalyse des R oches et des M inéraux
SEM-EDX	S canning E mission M icroscope- E nergy D ispersiv X -ray
SUP'AIR	S URveillance de la P ollution de l' A ir du N ord I sè R e
TSP	T otal S uspended P articles
UCC	U pper C ontinental C rust
UFR	U nité de F ormation et de R echerche

Table des matières

Liste des figures	19
Liste des tableaux	23
Chapitre I.....	25
Introduction Générale.....	25
I.1. Contexte de l'étude	26
I.1.1. Biosurveillance et retombées	26
I.1.2. Emissions élémentaires	30
I.1.3. Transport et dépôt	31
I.1.4. Effets sur l'environnement.....	34
I.1.5. Effets sur la santé humaine	36
I.2. Organisation française et internationale de la surveillance des métaux d'origine atmosphérique	37
I.2.1. Convention de Genève	37
I.2.2. Directives Européennes et LAURE	39
I.2.2.1. Directives Européennes	39
I.2.2.2. Loi LAURE (Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie)	40
I.2.3. Surveillance des teneurs ambiantes.....	42
I.2.3.1. L'ASCOPARG (Association pour le Contrôle et la Préservation de l'Air en Région Grenobloise)	43
I.2.3.2. L'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie)	44
I.2.3.3. Les DREAL (Directions Régionales de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement)	45
I.2.4. Surveillance des dépôts.....	45
I.3. Les métaux lourds dans les écorces d'arbres	47
I.3.1. Les éléments nutritifs d'origine biogénique.....	47
I.3.2. Les métaux lourds	47
I.3.3. Les micropolluants organiques	48
I.3.4. Bioindication et bioaccumulation	49
I.3.5. Utilisation des écorces comme bioaccumulateurs.....	49
I.3.6. Les facteurs qui influent sur les concentrations élémentaires dans l'écorce.....	51
I.4. Objectif de la recherche	53

Chapitre II

Matériel et méthodes

II.1. Définition de la station expérimentale.....	58
II.1.1. Site d'étude	58
II.1.2. Définition d'une station et de ses référents.....	59
II.2. Principes d'analyses	61
II.2.1. ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer)	61
II.2.2. PIXE (Proton Induced X-ray Emission) (Figure 2.4)	62
II.2.3. SEM-EDX (Scanning Electron Microscope – Energy Dispersive X ray)	64
II.3. Echantillonnage	66
II.3.1. Lavage du dépôt sur les écorces	66
II.3.2. Prélèvements de rameaux et de feuilles	67
II.3.3. Prélèvements des écorces.....	67
II.3.4. Perte au feu	67
II.3.5. Fractionnement des cendres	68
II.3.6. Quantification de la taille des particules.....	68
II.3.7. Recherche de lieux d'accumulation	68
II.3.8. Prélèvement des dépôts sur paroi d'un tunnel autoroutier.....	69
II.4. Etude du matériel végétal utilisé	69
II.4.1. Culture de plantes en salle conditionnée.....	69
II.4.2. Observation de l'anatomie d'une tige de frêne	69
II.4.3. Fractionnement des tissus d'une tige	74
II.4.4. Récupération d'une fraction de sève brute dans des vaisseaux du bois.....	75
II.4.5. Potomètre	76
II.5. Etude de l'effet de la pluie sur le dépôt de surface.....	77
II.5.1. Récolte d'eau de pluie ruissellant sur le tronc (Figure 2.14)	77
II.5.2. Traitement des eaux de pluie récoltées	78

Chapitre III

Stratégie de recherche

III.1. Introduction	80
III.2. Choix de la matrice	83

III.3. Choix de l'espèce	84
III.4. Choix de l'âge des rameaux	84
III.5. Séparation SUR et DANS l'écorce	85
III.6. Le dépôt libre est un écosystème. Comment analyser la partie d'origine anthropique ?	86
III.7. Le suber est le tissu le plus contaminé. Comment y différencier les éléments d'origine exogène des éléments issus de l'absorption racinaire ?	88
III.8. Eléments sous forme dispersée ou ionique ou sous forme particulière ? Etude par l'imagerie SEM-EDX et PIXE	89

Chapitre IV

Etude des dépôts atmosphériques superficiels non intégrés dans les tissus des troncs. Comparaison avec des dépôts sur des matrices inertes

IV.1. Introduction	92
IV.2. Matériel et méthodes	93
IV.2.1. Mise au point d'une méthode d'obtention du dépôt de surface	93
IV.3. Résultats	94
IV.3.1. Etude de la composition du dépôt superficiel	94
IV.3.1.1. Etude comparée du dépôt de surface de 7 espèces d'arbres	94
IV.3.1.2. Cinétique de formation et d'accumulation de dépôt superficiel chez le frêne.....	94
IV.3.1.3. Composition élémentaire des dépôts superficiels chez le frêne.....	96
IV.3.1.4. Fraction hydrosoluble et fraction centrifugeable au sein du dépôt de surface	99
IV.3.1.5. Analyse PIXE et SEM-EDX du dépôt superficiel	100
IV.3.1.6. Possibilités de sortie des éléments hors des tissus des tiges de troncs.....	105
IV.3.1.7. L'enlèvement du dépôt par la pluie.....	107
IV.3.1.7.1. Etude de la capacité d'enlèvement du dépôt par la pluie sur l'écorce de frêne.....	107
IV.3.1.7.2. Comparaison du lessivage par la pluie avec un lessivage artificiel	107
IV.3.1.7.3. Recherche des variables explicatives des valeurs du lessivage par la pluie.....	108
IV.3.1.8. Êtres vivants identifiés dans le dépôt de surface.....	110
IV.3.1.9. Schéma résumant les caractéristiques des dépôts de surface	113

Chapitre V

Intégration des constituants atmosphériques à l'intérieur des tiges et des troncs

V.1. Généralités.....	116
V.2. Mise au point d'un fractionnement tissulaire	119
V.2.1. Description de la méthode	120
V.3. Distribution des éléments dans une tige de frêne de 4 ans	125
V.3.1. Visualisation des éléments majeurs par la méthode PIXE sur une coupe transversale de tige de 4 ans	125
V.3.2. Analyse par ICP-MS des éléments présents dans les différents tissus séparés	126
V.3.3. Accumulation des éléments par unité de surface.....	128
V.4. Recherche d'un profil élémentaire pour le frêne en absence d'apport polluant atmosphérique	134
V.5. Discussion	137

Chapitre VI

Le mélange d'éléments atmosphériques d'origine anthropique présents sur et dans les tiges d'arbres. Essai d'évaluation qualitative et quantitative

VI.1. Introduction.....	140
VI.2. Principe d'une estimation approximative de l'AAEF.....	141
VI.3. Résultats	145
VI.3.1. Proportion des éléments dans l'AAEF par rapport au total élémentaire du dépôt de surface (Tableau 6.2)	145
VI.3.2. Proportion des éléments dans l'AAEF dans le total élémentaire du suber	147
VI.3.3. Comparaison au dépôt libre de frênes des Seiglières (1100 m alt., Belledonne)...	148
VI.3.4. Comparaison au dépôt libre sur les parois du tunnel de L'Epine de l'autoroute A43.....	148
VI.3.5. Concentrations élémentaires dans l'AAEF	149
VI.4. Discussion	149

Chapitre VII

Présence et distribution de particules solides dans les matrices étudiées

VII.1. Introduction.....	152
--------------------------	-----

VII.2. Fondement des méthodes utilisables pour étudier les particules solides	152
VII.3. L'observation fondatrice sur des coupes transversales de tiges de frênes en PIXE	153
VII.4. Etude des coupes microscopiques en SEM-EDX	153
VII.4.1. L'observation SEM (Scanning Electron Microscope)	153
VII.4.2. L'utilisation de l'EDX (Energy-Dispersive X-ray)	153
VII.4.3. L'étude EDX de la distribution interne des particules	159
VII.5. Etude des cendres en SEM-EDX	159
VII.6. Etude SEM-EDX des 3 fractions (H ₂ O, HNO ₃ 2N et solide) issues du traitement des cendres de suber	162
VII.6.1. La phase solide	162
VII.6.2. Fraction D (HNO ₃ 2N)	167
VII.6.3. Fraction C (H ₂ O) (Figures 7.18a et b)	170
VII.7. Analyse en ICP-MS des éléments présents dans les fractions C (H ₂ O), D (HNO ₃ 2N) et E (résidu solide)	172
VII.8. Discussion	174

Chapitre VIII

Discussion - Conclusion

VIII.1. Récapitulatif des travaux réalisés	178
VIII.2. Les pollutions atmosphériques et leur déposition	179
VIII.3. La mesure du dépôt atmosphérique élémentaire sur les troncs d'arbres	180
VIII.4. Comparer ce qui était présent dans l'atmosphère à ce qui a été retenu par l'écorce d'arbre : un but à atteindre	182
VIII.5. Le dépôt : un mélange d'apports géogéniques, biogéniques et anthropogéniques	184
VIII.6. L'intégration d'une phase solide dans une matrice durable : l'espérance d'un archivage atmosphérique	186
VIII.7. Une piste nouvelle : l'exploration des intégrations aléatoires	186
VIII.8. La matrice "arbre" pour une utilisation cartographique et chronologique de la pollution atmosphérique élémentaire	187
Bibliographie	189

Liste des figures

Figure 1.1 : Illustration de la pénétration des particules dans le système respiratoire en fonction de leur taille.....	27
Figure 1.2 : Répartition d'émission de différents polluants (TSP ; PM 10 ; PM 2,5 ; Cu, Pb, Ni, Se, Cr, As, Cd, Zn et Hg) pour la région Rhône-Alpes en 2000.	32
Figure 1.3 : Emission, transport et dépôt des métaux sous forme particulaire.	33
Figure 1.4 : Transfert des métaux dans l'environnement en milieu continental.	35
Figure 1.5 : Carte de répartition des associations agréées pour la surveillance de la qualité de l'air (AASQA) en France.	43
Figure 2.1 : Illustration du relief autour de la ville de Grenoble.....	58
Figure 2.2 : Localisation du site d'étude d'altitude : le marais des Seiglières.....	60
Figure 2.3 : Principe du fonctionnement de l'ICP-MS	62
Figure 2.4 : Principe du fonctionnement de la méthode PIXE	63
Figure 2.5 : Exemple de spectre PIXE pour une cible multi-élémentaire.....	64
Figure 2.6 : Principe du fonctionnement du SEM-EDX.....	65
Figure 2.7 : Schéma illustrant l'échantillonnage du dépôt de surface sur le tronc en place ...	66
Figure 2.8 : Histologie dans une tige de frêne âgée de 1 an.....	72
Figure 2.9 : Structure anatomique d'une tige de frêne de 1 an (coupe transversale).....	73
Figure 2.10 : Schéma illustrant la succession des tissus d'une tige au cours de sa croissance.	74
Figure 2.11 : Schéma illustrant le principe de séparation des tissus sur une tige fraîche de dicotylédone.	75
Figure 2.12 : Illustration des vaisseaux conducteurs fonctionnels du bois après le passage d'un colorant hydrosoluble.....	76
Figure 2.13 : Schéma illustrant le principe du potomètre	76
Figure 2.14 : Schéma du montage réalisé pour la récolte d'eau de pluie sur jeunes frênes....	77
Figure 3.1 : Schéma résumant la stratégie expérimentale choisie.....	81
Figure 3.2 : Inventaire des matrices soumises à l'analyse (ICP-MS, PIXE, SEM-EDX) et séparables en 2 ensembles : a) les dépôts plus ou moins directement d'origine atmosphérique, b) l'espèce d'arbre étudié.....	82

Figure 3.3 : Schéma montrant l'emplacement et la structure de la couche de suber chez les arbres dicotylédones.....	85
Figure 3.4 : Illustration d'organismes entrant dans la composition du dépôt de surface.....	86
Figure 3.5 : Schéma illustrant la composition du dépôt superficiel (moyenne \pm E.T) sur des écorces de frêne (<i>Fraxinus excelsior</i>) âgés de 3 à 40 ans et sur des écorces d'arbres âgées de 40 ans (<i>Populus nigra</i> , <i>Betula alba</i> and <i>Fagus sylvatica</i>).	88
Figure 4.1 : Hypothèses sur les étapes de transfert des éléments de l'atmosphère vers l'arbre.....	92
Figure 4.2 : Masse sèche moyenne (n = 3) du dépôt par unité de surface en fonction de l'âge des rameaux de frêne.....	95
Figure 4.3 : Analyse PIXE de 6 éléments : Ca, K, Mn, Fe, Zn et Cu sur un dépôt obtenu par lavage de l'écorce d'un frêne de 4 ans. Les concentrations sont données en unité arbitraire sur le côté droit des images PIXE.....	101
Figure 4.4 : Surface de l'écorce d'une tige de frêne de 4 ans observé au microscope électronique à balayage, illustration du dépôt de surface.....	102
Figure 4.5 : Spectres d'émission de rayons X de 3 particules analysées par SEM-EDX dans le dépôt de surface (indiqués par les numéros 1 à 17 dans la figure 4.4).	103
Figure 4.6 : cliché d'un dépôt de surface après traitement à l'eau oxygénée (H ₂ O ₂) d'une écorce de frêne de 4 ans (SEM-EDX, grossissement \times 1360).	104
Figure 4.7 : Analyse PIXE de la répartition du potassium dans les différents tissus d'une coupe transversale de tige de frêne de 4 ans.	106
Figure 4.8 : Identification par SEM-EDX de la distribution de 8 éléments (O, K, Ca, P, Mg, Si, Al et Fe) à la surface d'une lenticelle sur une tige de frêne de 4 ans.	106
Figure 4.9 : Composition du dépôt de surface sur les écorces d'arbres et fonctionnement de cet écosystème.	111
Figure 4.10 : Schématisation des échanges entre les 5 compartiments mis en jeu dans le cas d'un apport superficiel sur un tronc d'arbre.....	113
Figure 4.11 : Schéma résumant les caractéristiques des dépôts de surface.	114
Figure 5.1 : Ensemble des voies hypothétiques de transfert de matière de l'atmosphère vers l'intérieur des tiges.....	116
Figure 5.2 : Schéma théorique d'une coupe longitudinale de tige distinguant, à l'échelle anatomique, les espaces symplasmiques et apoplastiques.	118
Figure 5.3 : Schéma général de distribution d'éléments dispersés à l'intérieur d'une tige. .	119

Figure 5.4 : Base anatomique du fractionnement mécanique d'une tige chez <i>Fraxinus excelsior</i> L.	121
Figure 5.5 : Photo d'une coupe transversale d'une tige de frêne de 4 ans au niveau du bois après le passage d'un colorant hydrosoluble.	122
Figure 5.6 : Schéma illustrant la séparation des différentes couches de tissus de tige de frêne de 4 ans.	123
Figure 5.8 : Analyse PIXE sur une coupe transversale d'une tige de <i>Fraxinus excelsior</i> L. de 4 ans montrant la distribution de Ca, K et Fe. Les concentrations sont données en unités arbitraires sur le côté droit des images PIXE.	125
Figure 5.9 : Concentrations de 9 éléments (Fe, Pb, Cr, Ni, V, Cd, Zn, Mn et Cu) dans les différents tissus d'une tige de <i>Fraxinus excelsior</i> L de 4 ans.	128
Figure 5.10 : Schéma montrant la structure anatomique et la teneur en plomb dans une tige de 4 ans (<i>Fraxinus excelsior</i> L.).	130
Figure 5.11 : Intégration et diffusion des éléments du dépôt de surface vers les tissus internes.	133
Figure 6.1 : Schéma de synthèse de la démarche de calcul d'AAEF.	142
Figure 7.1 : Images PIXE montrant la présence de particules solides et la distribution de Fe, Zn et Mn sur une coupe transversale de suber de <i>Fraxinus excelsior</i> L. de 4 ans. L'encadré noir sur l'image A montre la région analysée pour obtenir la série d'images B. les échelles de couleur sont arbitraires et varient selon l'élément. Le niveau de couleur représente le nombre de coups total par pixel dans la région d'intérêt du spectre des rayons X.	154
Figure 7.2 : Clichés SEM sur des coupes de tige de frêne de 4 ans. a) vue d'ensemble d'une coupe transversale (grossissement $\times 87$), b) vue d'une coupe transversale au niveau du bois (grossissement $\times 190$), c) vue d'une coupe longitudinale au niveau du phloème (montrant inclusions minérales et amidon) (grossissement $\times 811$), d) vue d'une coupe transversale au niveau du phloème montrant l'énorme stock de cristaux organo-calciques.	155
Figure 7.3 : Spectre élémentaire global par SEM-EDX d'une coupe tangentielle de tige de frêne dans la zone subérienne.	155
Figure 7.4 : Image SEM-EDX ($400 \times 300 \mu\text{m}$) d'une coupe transversale dans un suber lavé d'une tige de frêne de 4 ans (grossissement $\times 291$).	157
Figure 7.5 : Choix de 16 particules minérales dans le rectangle $100 \times 80 \mu\text{m}$ montré dans la Figure 7.4 (grossissement $\times 1164$).	157

Figure 7.6 : Spectres d'émission de rayons X de 3 particules intégrées analysées par SEM-EDX dans la coupe au niveau du suber	158
Figure 7.7 : Spectres globaux d'émission de rayon X de la face interne (Spectre 1) et de la face externe (Spectre 2) de coupes tangentielles.....	160
Figure 7.8 : Spectre d'émission global des cendres de suber.....	161
Figure 7.9 : Schéma explicatif des différentes étapes de la procédure de fractionnement en vue de l'isolement des particules solides	161
Figure 7.10 : Image SEM-EDX du mélange de particules solides qui sont présentes dans le résidu des cendres de suber après traitement à l'acide chlorhydrique.	162
Figure 7.11 : Spectres d'émission de rayon X de 3 particules analysées par SEM-EDX.....	163
Figure 7.12 : Spectre d'émission global de la phase solide obtenue après fractionnement de cendres de suber	164
Figure 7.13 : a) Image SEM d'une cendre volante d'aluminium (marquée "C.V" sur la photo) dans le culot des cendres traitées à HNO_3 2N. b) Spectre d'émission des rayons X de la cendre volante analysée par SEM-EDX (Figure 7.13a).....	165
Figure 7.14 : Observation en microscopie électronique à balayage de cendres volantes présentes dans le dépôt de surface et dans l'écorce superficielle.....	166
Figure 7.15 : Identification par SEM-EDX de la distribution de 8 éléments (Si, Al, Fe, Na, Mg, S, Ti et Cr) dans le résidu solide obtenu après traitement à HCl 2N.....	168
Figure 7.16 : Distribution des particules suivant leur taille dans le culot E après traitement acide des cendres de suber (a) ou du dépôt de surface (b)	169
Figure 7.17 : a) Image SEM du culot desséché de la fraction D (HNO_3 2N) et b) spectre EDX correspondant	170
Figure 7.18 : a) Image SEM du culot desséché de la fraction C (H_2O) majoritairement constitué de K_2O , b) beau cristal de Na_2O et c) spectre EDX de la fraction C.....	171
Figure 7.19 : Distribution élémentaire (%) de 17 éléments entre les fractions C, D et E.....	173
Figure 7.20 : Schéma illustrant l'importance quantitative de chaque fraction A, B, C, D et E ; $C + D + E = B = \text{masse des cendres}$, $C = \text{fraction } \text{H}_2\text{O}$, $D = \text{fraction } \text{HNO}_3$, $E = \text{fraction solide résiduelle; OM, Matière Organique}$	174
Figure 8.1 : Schéma illustrant la succession des rameaux d'âges différents sur un même arbre.....	181

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Sources de contamination en métaux lourds et en métalloïdes dans l'environnement	32
Tableau 1.2 : Impact des métaux sur la santé humaine.....	37
Tableau 1.3 : Dispositifs de surveillance des retombées atmosphériques en pollution de fond.....	46
Tableau 3.1 : Composition élémentaire (en $\mu\text{g.g}^{-1}$) du suber de frêne. Composition de référence établie par l'analyse de suber de frêne cultivé en salle conditionnée.....	89
Tableau 4.1 : Masse sèche du dépôt total (par dm^2) et du contenu minéral sur les troncs et les feuilles.....	95
Tableau 4.2 : Etude du rapport masse des éléments/masse organique dans le dépôt de surface sur écorce de frênes âgés de 2 mois à 40 ans	96
Tableau 4.3 : Concentration des éléments ($\mu\text{g.g}^{-1}$) dans le dépôt sur l'écorce de frêne de 1 à 5 ans.....	96
Tableau 4.4 : Concentration des éléments ($\mu\text{g.g}^{-1}$) dans le dépôt sur l'écorce de frêne de 5 à 20 ans.....	96
Tableau 4.5 : Concentration des éléments ($\mu\text{g.g}^{-1}$) dans le dépôt de deux échantillons d'écorce de frêne de 40 ans	97
Tableau 4.6 : Part de chaque élément dans le dépôt de surface (% exprimés sur le total des concentrations des éléments communs aux 3 séries de dosages).....	97
Tableau 4.7 : Différences du rapport des éléments entre deux échantillons d'écorce de frêne de 40 ans.....	98
Tableau 4.8 : Relation quantitative (culot/dépôt %) entre le culot et le dépôt initial pour chaque élément.....	99
Tableau 4.9 : Valeurs moyennes (\pm E.T, $n=3$) de transpiration ($\text{ml.dm}^{-2}.\text{j}^{-1}$) trans-subériennes et foliaires mesurées à l'aide de potomètres sur des rameaux de frênes de 4 ans.....	105
Tableau 4.10 : Volumes des lessivats, volumes témoins, masse de dépôt enlevée à l'écorce et "surface utile" par la pluie pour chaque épisode pluvieux sur un an et demi.....	109
Tableau 5.1 : Caractéristiques des différentes fractions isolées à partir d'une tige de frêne de 4 ans.....	126

Tableau 5.2 : Concentration de 14 éléments (V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Sb, Ba, Ti, Pb) par unité de surface ($\mu\text{g}/\text{dm}^2$) dans le dépôt superficiel et dans les différents tissus d'une tige	131
Tableau 5.3 : Rapport des concentrations de chaque élément étudié dans des tiges de frênes poussés sur la station (St) et celle des frênes comparables poussés en salle conditionnée (SC).....	135
Tableau 5.4 : Composition de l'extrait sec ($\mu\text{g.g}^{-1}$) obtenu par lavage à l'eau distillée des vaisseaux du bois de tiges de frêne de 4 ans	136
Tableau 6.1 : Composition élémentaire (en $\mu\text{g.g}^{-1}$) des formules de référence de la matière organique et de la fraction géogénique.	143
Tableau 6.2 : Etapes du calcul de l'AAEF pour un dépôt de surface sur écorce (campus)..	145
Tableau 6.3 : Valeurs d'AAEF (%) sur les dépôts libres récoltés sur des rameaux de frênes d'âges différents de la station campus.....	146
Tableau 6.4 : Classement des éléments en fonction du rapport AAEF/échantillon total (%) dans le dépôt de surface sur des rameaux de frênes du campus.....	146
Tableau 6.5 : Valeurs d'AAEF (%) dans le suber récolté sur des rameaux de frênes de la station campus d'âges différents.	147
Tableau 6.6 : Classement des éléments en fonction du rapport AAEF/échantillon total (%) dans le suber de rameaux de frênes du campus.....	147
Tableau 6.7 : Classement des éléments en fonction du rapport AAEF/échantillon total (%) dans le dépôt de surface sur des rameaux de frênes des Seiglières.....	148
Tableau 6.8 : Classement des éléments en fonction du rapport AAEF/échantillon total (%) dans le dépôt de surface du tunnel de Lépine.....	148
Tableau 7.1 : Composition de 16 particules choisies dans la figure 5.5 et proposition de leur origine	156
Tableau 7.2 : Distribution élémentaire moyenne (\pm E.T ; n=3) de 18 éléments dans les fractions C, D et E (μg pour 1g sec) de suber de frêne âgé de 4 ans.....	172
Tableau 7.3 : Concentrations ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de masse sèche) élémentaires moyennes (\pm E.T) dans la fraction E.....	173
Tableau 8.1 : Profils comparés de concentrations relatives pour l'atmosphère de Saclay et les dépôts sur frêne à Grenoble pendant la même période	184
Tableau 8.2 : Liste des éléments d'origine anthropogénique détectés en SEM-EDX	187

Chapitre I

Introduction générale

Ce travail se propose d'apporter des éléments de compréhension concernant l'accumulation des polluants atmosphériques métalliques sur et dans les écorces d'arbres. La première partie de cette introduction abordera le contexte de l'étude avec notamment les questions d'émission, de transport et des risques sur la santé des polluants d'origine atmosphérique. La partie suivante présentera le contexte administratif et politique dans lequel se place cette étude. Une troisième partie résume l'historique de l'emploi des arbres dans l'étude des pollutions atmosphériques. Cette introduction sera clôturée par la présentation de nos objectifs de recherche.

I.1. Contexte de l'étude

Le milieu atmosphérique est contaminé par de nombreux polluants dont les éléments métalliques rejetés par les industries, le trafic, l'agriculture et les communautés urbaines. Les zones enclavées et à atmosphère peu renouvelée (comme la cuvette grenobloise) sont les plus touchées par cette contamination. L'évolution de la pollution atmosphérique est suivie grâce à des programmes de recherche (POVA : Pollution dans les Vallées Alpines) et de surveillance (ASCOPARG : Association pour le Contrôle et la Préservation de l'Air en Région Grenobloise) à différentes échelles géographiques.

Les métaux lourds sont présents dans l'atmosphère avec des teneurs que les activités industrielles du siècle dernier avaient considérablement augmentées et qu'il est aujourd'hui très difficile de maîtriser malgré des progrès marquants, en particulier pour le fluor, le plomb et le dioxyde de soufre (Kierdorf *et al.*, 1999 ; Rey-Asensio et Carballeria, 2007 ; Aznar *et al.*, 2008). Une partie incompressible de ces apports a une origine naturelle, par érosion et dispersion éolienne de la croûte terrestre et surtout par les émissions volcaniques (Hutton, 1983 ; Saha *et al.*, 2006 ; Vallès *et al.*, 2009). De nombreuses études épidémiologiques établissent aujourd'hui sans ambiguïté que cette contamination atmosphérique élémentaire n'est pas sans incidence pour la santé humaine, certains éléments ayant une toxicité avérée, comme le plomb, le mercure, le cadmium ou l'arsenic (Schubert, 1973 ; Peters *et al.*, 1986). De plus, des études récentes ont fait apparaître que l'inhalation de particules de petites tailles ($< 10 \mu\text{m}$) permettait d'atteindre les alvéoles pulmonaires et en altérait gravement le fonctionnement (Freer-Smith *et al.*, 2005). Le diamètre de divers types de particules et la pénétration de ces particules dans le système respiratoire sont illustrés dans la **Figure 1.1**.

Sur ce point, il a aussi été démontré que les nanoparticules (0,010 à 0,056 μm) contiennent plus d'éléments métalliques dus au trafic (Pb, Cd, Cu, Zn, Br et Ni) que les autres (Lin *et al.*, 2005).

I.1.1. Biosurveillance et retombées

Tous les composés ou éléments chimiques libérés dans l'atmosphère qui résultent principalement des activités humaines et qui peuvent causer des dommages chez les organismes vivants, sont considérés comme des polluants de l'air (Moriarty, 1999).

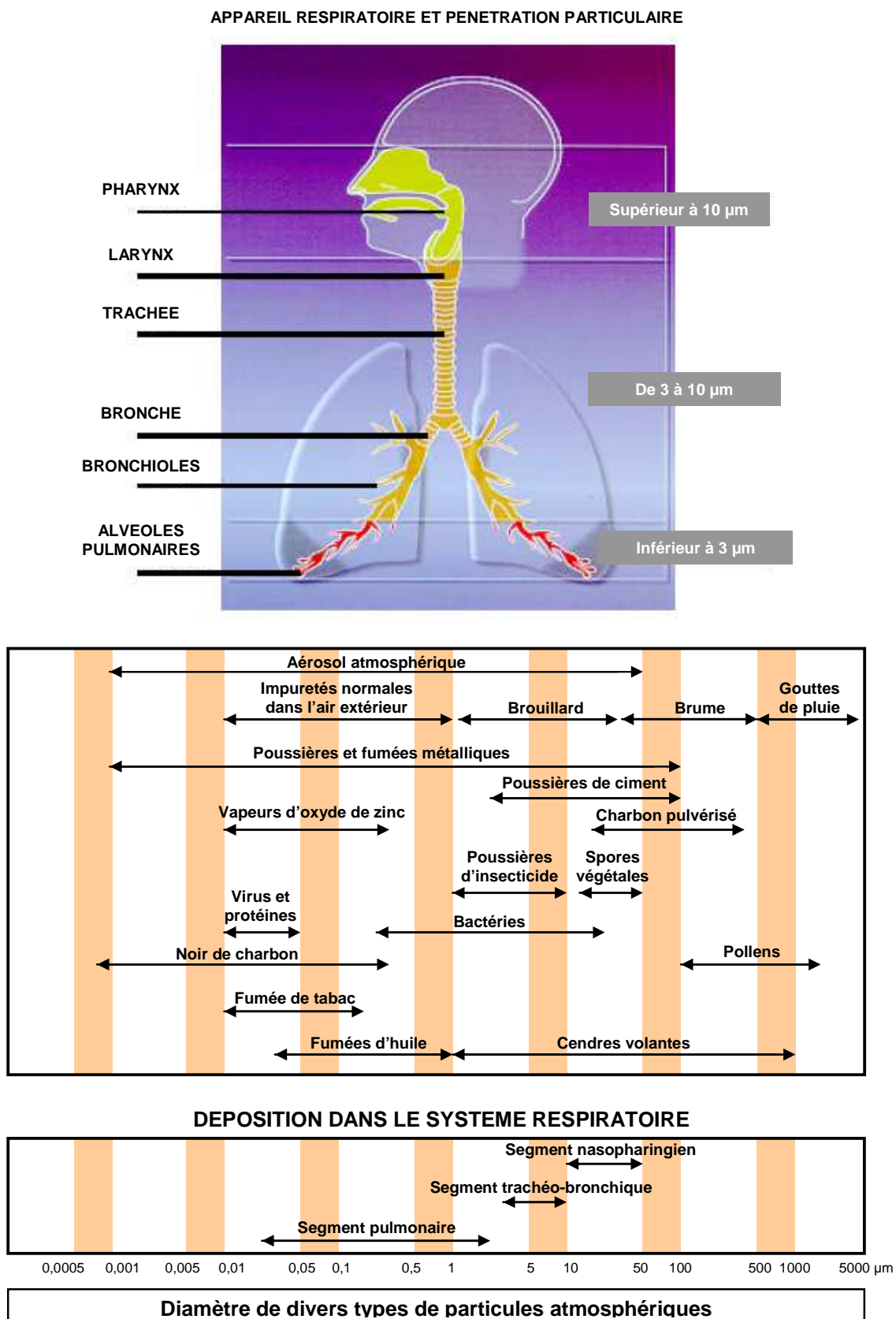


Figure 1.1 : Illustration de la pénétration des particules dans le système respiratoire en fonction de leur taille.
 Source : CITEPA, 2001. Inventaire des émissions de particules primaires. <http://www.citepa.org>

La majorité des métaux lourds, des composés soufrés et des composés azotés sont considérés comme des polluants provenant surtout de sources d'origine anthropique (Pitcairn *et al.*, 1995 ; Whelpdale *et al.*, 1998 ; Pacyna et Pacyna, 2001). Parmi les sources naturelles de ces composés, on compte : les volcans, les incendies de forêts, les processus de décomposition biologique et les océans (Nriagu, 1989). L'intensité de ces émissions dépend de la propagation, du type de source d'émission et des conditions météorologiques. Une proportion élevée des composés émis reste proche de la source, mais certains composés peuvent voyager à des milliers de kilomètres. En général, les composés soufrés et azotés diffusent dans l'atmosphère sous forme de gaz, alors que les métaux lourds se fixent à des particules. En règle générale, les métaux qui ont une densité supérieure à $4,5 \text{ g.cm}^{-3}$ sont appelés métaux lourds (Wittig, 1993). Cependant, l'utilisation du terme a été critiquée car la limite est artificielle et il n'y a pas de raison biologique à son utilisation (Hodson, 2004).

La qualité de l'air peut être contrôlée par la mesure de polluants directement dans l'air ou dans le dépôt, par la construction de modèles décrivant la propagation des polluants, ou en utilisant la biosurveillance (ensemble de méthodes fondées sur l'observation des altérations fonctionnelles d'êtres vivants) (Markert *et al.*, 2003). Des mesures directes permettent de fournir des informations objectives sur la concentration atmosphérique des polluants, mais elles sont coûteuses et il existe un risque de contamination lors de la détermination de faibles concentrations. Les modèles fournissent des informations sur de vastes étendues et ils peuvent être utilisés pour produire des prévisions généralistes sur la qualité de l'air. Toutefois, leur précision dépend de la qualité des données utilisées dans la construction des modèles.

Les méthodes de biosurveillance fournissent des informations sur la quantité de polluants ainsi que leurs effets sur les organismes qui ont été en contact avec les polluants. La biosurveillance se définit comme "l'utilisation des réponses à tous les niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, tissulaire, morphologique, écologique) d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes pour prévoir et/ou révéler une altération de l'environnement et pour en suivre l'évolution" (Garrec et Van Haluwyn, 2002).

Les végétaux sont des outils de grand intérêt pour la biosurveillance. Leur diversité offre un large éventail d'organismes utilisables : Bryophytes, Lichens, Plantes supérieures (plantes herbacées, feuilles et écorces des arbres...) qui sont employés spécifiquement ou non pour détecter un grand nombre de polluants (ozone, oxydes d'azote, métaux lourds, HAP, dioxines, pesticides...).

En général, on distingue deux principes de biosurveillance :

1) La biosurveillance dite sensible, qui utilise des organismes répondant au stress causé par la pollution. La mesure de cette sensibilité se fonde sur trois concepts :

- **le biomarqueur** qui se situe au niveau infra-individuel : altérations moléculaires, biochimiques, cellulaires ou physiologique non visibles. Exemples : dégradation d'activités enzymatiques, ou modification de la respiration, de la photosynthèse et des constituants cellulaires tels que la chlorophylle a et b, les protéines solubles (Gonzalez et Pignata, 1997) ;
- **le bioindicateur** qui se place au niveau individuel : altérations physiologiques, tissulaires ou morphologiques visibles d'un organisme. Exemple : apparition de nécroses sur des plants de tabac exposés à l'ozone (Saitanis et Karandinos, 2001) ;
- **le biointégrateur** qui se situe au niveau de la population et/ou de la communauté voire de l'écosystème : variation densitaire, présence/absence d'espèces. Exemple : diagnostic écolichénique pour déterminer un indice de pureté atmosphérique (Piervittori et Maffei, 2001).

2) La biosurveillance par accumulation, qui utilise des organismes ayant la capacité de stocker les polluants dans leurs tissus (bioaccumulateurs) suite à des mécanismes de fixation et/ou de transfert. Le bioaccumulateur sert ici de matrice de dosage de différents polluants. Il doit répondre aux spécifications suivantes (Conti et Cecchetti, 2001) :

- accumuler le(s) polluant(s) et ce, sans disparaître ;
- fournir suffisamment de tissus pour l'analyse ;
- avoir un facteur de concentration suffisant pour pouvoir être analysé directement sans pré-concentration ;
- présenter une concentration tissulaire du polluant représentative du niveau de contamination de l'environnement.

On distingue principalement deux stratégies de mise en œuvre de la biosurveillance :

a) la première, appelée "**méthode *in situ***" (ou biosurveillance passive), utilise les organismes déjà présents sur le site (organismes indigènes). Elle a l'avantage d'être rapide. En effet, les végétaux ayant déjà été exposés aux polluants, il ne reste plus qu'à les collecter et à les analyser. On doit cependant veiller à ce qu'ils aient (Conti et Cecchetti, 2001) :

- une distribution spatiale et une abondance suffisante pour être représentatifs de la zone étudiée ;
- une saisonnalité compatible avec les objectifs de la campagne de mesure,
- un mode de collecte facile.

La densité et la localisation des emplacements de prélèvement doivent répondre aux objectifs de l'étude. Les enquêtes à grande échelle couvrant de grands domaines exigent évidemment

plus d'emplacements que les études de sources ponctuelles d'émission. Pour ces dernières, les sites d'échantillonnage sont fréquemment choisis le long de transepts ou de gradients par rapport à la source de pollution.

Cependant, l'utilisation d'espèces indigènes limite bien souvent le nombre et la localisation des emplacements. A l'emplacement de prélèvement, une certaine attention devrait être accordée au substrat, celui-ci pouvant affecter la composition élémentaire de l'espèce étudiée.

b) La seconde appelée "**méthode des transplants**" (ou biosurveillance active) emploie des organismes dit transplantés. Elle peut être utilisée par exemple lorsque la méthode *in situ* n'est pas envisageable (absence d'organismes correspondant aux critères de l'étude). Cette dernière nécessite plus de temps. En effet, il faut laisser le temps aux transplants (organismes provenant d'une zone "saine") d'accumuler les polluants présents dans leur nouvel environnement, cette phase d'exposition pouvant être plus ou moins longue selon le type d'organismes choisi et le polluant étudié.

La transplantation est une technique expérimentale où les organismes utilisés pour l'étude sont transférés d'un environnement non pollué (milieu dit "sain" : zone rurale...) vers un site pollué ou suspecté de l'être. Cette alternative à la méthode *in situ* permet de palier les problèmes suivants :

- l'absence d'espèces utilisables dans la zone d'étude (niveau de pollution trop élevé, absence d'habitats du fait de l'urbanisation, de l'industrialisation ou de l'altitude) ;
- la mauvaise répartition d'une espèce qui ne lui permet pas un échantillonnage représentatif de la zone d'étude.

Mais l'avantage principal de la transplantation est qu'elle permet un total contrôle du temps d'exposition. Pour exploiter les résultats obtenus par la méthode des transplants, les concentrations initiales en polluants (avant la phase d'exposition) doivent être déterminées. Celles-ci sont souvent retranchées aux concentrations après exposition pour calculer les quantités d'éléments déposées pendant la période d'exposition.

Une présentation plus complète de la biosurveillance est décrite dans l'ouvrage de Jean-Pierre Garrec et Chantal Van Haluwyn (2002).

I.1.2. Emissions élémentaires

Si la plupart des métaux sont présents naturellement à l'état de traces dans le fond géochimique (sols, eaux), des quantités plus ou moins importantes sont également émises dans l'air par des sources d'émission naturelle ou liées aux activités humaines. On distingue

deux catégories principales de sources atmosphériques de métaux (Pacyna, 1986 ; Nriagu, 1989 ; Bargagli, 1998a et b).

- les sources d'origine naturelle :

- + les volcans (ex : As, Ni, Hg, Zn),
- + l'érosion de la croûte terrestre (ex : Si, Al, As, Cr, Fe, Ni, V),
- + les feux de forêt (ex : Zn),
- + les embruns marins (ex : Hg, Na, Cl) ;

- les **sources d'origine anthropique** sont liées à l'industrie, au transport et à l'agriculture, notamment (Ernst et Joosse Van Damme, 1983) :

- + la combustion des combustibles fossiles, pétrole et charbon dans l'industrie, le chauffage et les transports, ex : As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn,
- + l'extraction de minerais, ex : As, Fe, Ni, V...,
- + la métallurgie (industries du fer et de l'acier, ex : Pb, Cd, Ni ; et des métaux non ferreux, ex : As, Cd),
- + l'incinération des déchets ménagers (ex : Hg, Pb, Cd...),
- + et les engrais et pesticides (ex : Cd, Cu, As, Hg...).

A l'échelle mondiale, les émissions d'origine anthropique dépassent dorénavant les émissions d'origine naturelle pour bon nombre d'éléments comme le plomb, le cadmium, le zinc, l'arsenic et le mercure. En France également, on estime que les émissions métalliques d'origine anthropique sont beaucoup plus importantes que les émissions naturelles. La **Figure 1.2** décrit la répartition des émissions de particules et de métaux lourds dans la région Rhône-Alpes en 2000.

La diffusion globale des métaux lourds issus du trafic routier est un exemple de propagation diffuse, alors que l'émission de métaux lourds par les fonderies et les mines de fer est limitée à une zone relativement petite (**Tableau 1.1**).

I.1.3. Transport et dépôt

Le compartiment atmosphérique joue un rôle majeur dans la dispersion des métaux. Dans l'atmosphère, la plupart des éléments métalliques se trouvent associés à des aérosols, c'est-à-dire à des particules liquides et/ou solides en suspension dans l'air. Les aérosols sont en effet d'excellents porteurs de substances peu volatiles nuisibles à l'environnement, des composés toxiques comme les métaux lourds, qui se trouvent dans les poussières le plus

souvent sous forme d'oxydes, de silicates, de sulfures, de sulfates, de nitrates, de phosphates ou d'halogénures (Bliefert et Perraud, 2001). Ces particules sont transportées avec un temps de résidence plus ou moins long avant de retomber au sol.

La taille, la forme et la composition chimique des particules influencent fortement leur dispersion et leur durée de séjour dans l'atmosphère (**Figure 1.3**).

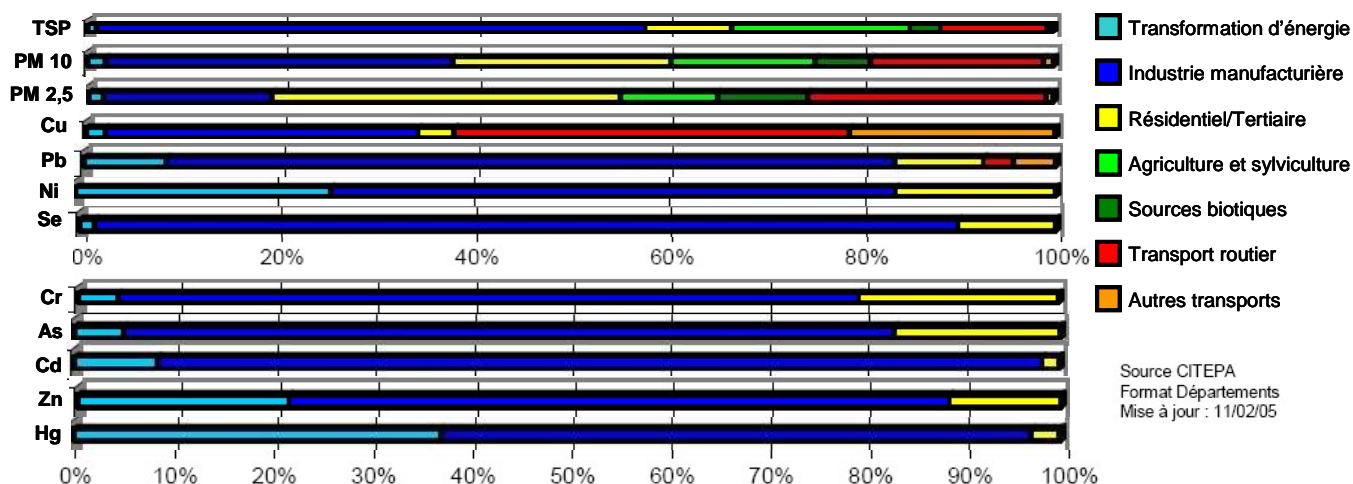


Figure 1.2 : Répartition d'émission de différents polluants (TSP ; PM 10 ; PM 2,5 ; Cu, Pb, Ni, Se, Cr, As, Cd, Zn et Hg) pour la région Rhône-Alpes en 2000.

TSP : Total Suspended Particles ; PM : Particle Matter.

Source : CITEPA, 2001. Inventaire des émissions de polluants atmosphériques en France en 2000.
<http://www.citepa.org>

Tableau 1.1 : Sources de contamination en métaux lourds et en métalloïdes dans l'environnement (d'après Ernst et Joosse Van Damme, 1983)

Source	Eléments courants
Industrie	
affleurements de minerai	Zn, Pb, Cu, Cd, Ni
fonderies de métaux	Zn, Cu, Cd, Pb, Sn, Ni
hauts-fourneaux	Fe, Zn, Mn
électrolyse	Hg
industrie du ciment	Tl
Trafic	
essence au plomb	Pb
catalyseurs	Al, Pt, Rh, Pd
émissions de métaux issus de pneumatiques	Ni, Cd, Zn
Emissions des ménages	
déchets	Cd, Pb, Cu, Zn, Ni
boues d'épuration	Cd, Pb, Cu, Zn, Ni
Gestion de l'énergie	
centrale de combustion du charbon	Se, B, Mn, Cd
combustion de pétrole	V, Ni
centrales nucléaires	U, Cs, Pu
lignes à haute tension	Cu, Zn
Agriculture	
additifs alimentaires	Cu, Zn
engrais	Cd
pesticides	Cu, Hg, As, Sn, Cl

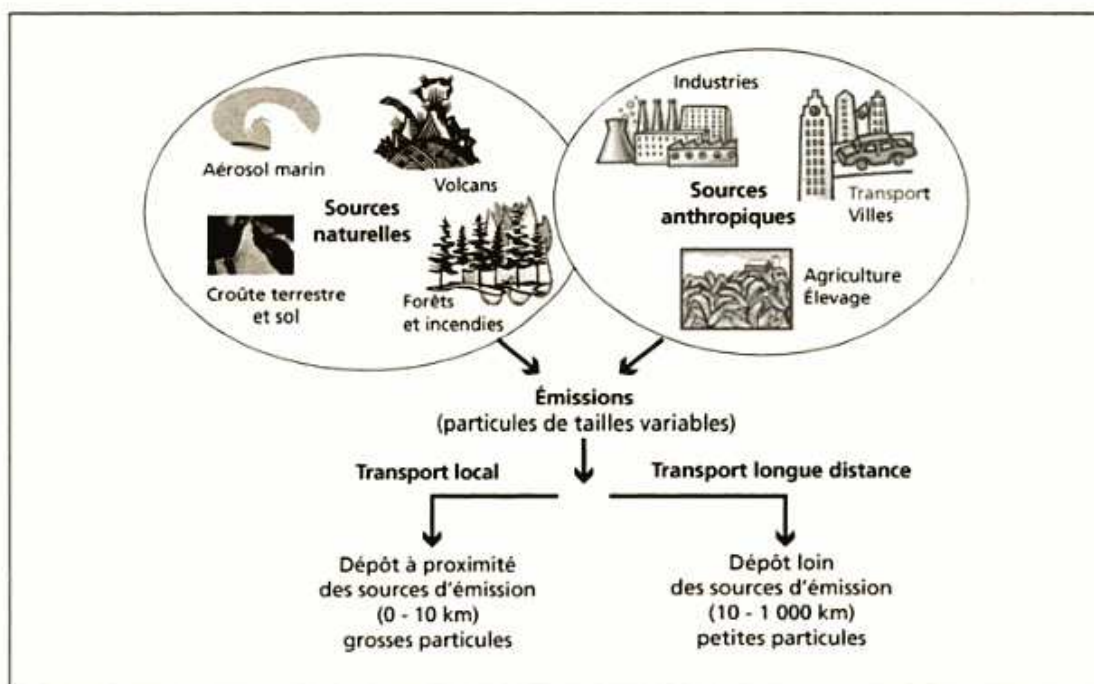


Figure 1.3 : Emission, transport et dépôt des métaux sous forme particulaire.

Source : Gombert et al., 2005

Les très grosses particules (diamètre de 10 à 100 μm) ont ainsi un temps de séjour court dans l'atmosphère et sont déposées à proximité des sources d'émission (transport local). Par contre, les particules les plus fines (diamètre de l'ordre du μm) restent plus longtemps dans l'atmosphère et peuvent ainsi être transportées par le vent sur de plus longues distances, à plus haute altitude et plus loin des sources d'émission (transport à longue distance). Le voyage des métaux s'achève selon des processus aux cinétiques différentes en fonction des conditions météorologiques, par dépôt sec (sédimentation) ou par dépôt humide (pluie, neige, brouillard, rosée...).

Des moyens d'échantillonnage appropriés permettent de mesurer les teneurs ambiantes en métaux lourds (ng de métal/ m^3 d'air), par exemple par prélèvement d'air et collecte sur filtre. Cette méthode est employée par l'ASCOPARG (Association pour le Contrôle et la Préservation de l'Air en Région Grenobloise) qui s'occupe du suivi de la qualité de l'air en région grenobloise et qui fournit chaque jour un "indice atmo" de la qualité de l'air. Des moyens d'échantillonnage permettent également de quantifier les dépôts de métaux (μg de métal/ m^2/an). Par exemple, les dépôts humides sont prélevés avec des collecteurs de pluie séquentiels à ouverture et fermeture automatiques, les dépôts secs par filtre, et les dépôts

totaux (sec et humide) avec des collecteurs de pluie ouverts, également appelés jauges Owen. Les dépôts totaux peuvent aussi être estimés en utilisant des organismes bioaccumulateurs.

I.1.4. Effets sur l'environnement

Les dépôts d'origine atmosphérique sont, pour les écosystèmes naturels, une charge supplémentaire par rapport aux teneurs naturelles du fond géochimique (sols, eaux) (**Figure 1.4**). On sait que l'exposition à un polluant atmosphérique comme les métaux lourds est connue pour provoquer des effets dommageables, à court ou à long terme, aux systèmes vivants (écosystème terrestre et aquatique) ou à des matrices inertes (patrimoine bâti, matériaux). Mais ces effets sont difficiles à quantifier puisqu'ils se produisent sur des systèmes présentant des seuils de vulnérabilité variables.

D'une manière générale, tous les végétaux et les groupes voisins sont des accumulateurs de métaux, qu'ils soient aquatiques (algues) ou terrestres (lichens, mousses, végétaux supérieurs...). Premier maillon des chaînes alimentaires, les végétaux sont le point de départ du transfert des métaux dans ces chaînes et peuvent ensuite se concentrer de manière parfois importante dans les niveaux trophiques supérieurs (bioamplification).

La pollution atmosphérique peut avoir des effets sur le fonctionnement des écosystèmes, aussi bien au niveau de la faune que de la flore. Les métaux lourds s'accumulent dans les organismes vivants et perturbent les équilibres et mécanismes biologiques. Un exemple frappant est l'accumulation du plomb issu des plombs de chasse par les gibiers d'eau (canards colverts, sarcelles...). En effet, les plombs de chasse, quand ils sont accessibles, sont souvent pris pour de la nourriture et/ou pour des graviers que l'oiseau stocke dans son gésier, ce qui conduit à de fortes concentrations de plomb et d'antimoine dans les tissus de l'animal (cas de l'étang de Berre).

D'autres polluants ont également une action spécifique sur les animaux. Le molybdène se traduit par une anémie et des lésions osseuses ; le zinc, le sélénium, l'acide arsénieux et le plomb tétraéthyle peuvent se traduire par des signes d'empoisonnement essentiellement digestif ; les cendres et les poussières de ciment provoquent également des troubles digestifs. Les suies sont capables de réaliser des anthracoses pulmonaires. Enfin, les insecticides, provoquent des accidents (effets sur la ponte, anomalies du développement embryonnaire, effets sur la vision et le comportement), spécialement chez les oiseaux (Chovin et Roussel, 1968).

La pollution atmosphérique métallique affecte aussi la faune du sol. Par exemple, en 2000, Marchionni *et al.* (2000) ont créé un modèle d'étude de l'impact de la pollution atmosphérique par les métaux lourds sur la biomasse microbienne du sol. Dans cette étude, la respiration, ainsi que la masse de biomasse par rapport à la masse de matière organique totale du sol ont été utilisées comme indicateurs de l'état du sol du fait de son niveau de contamination par les métaux lourds.

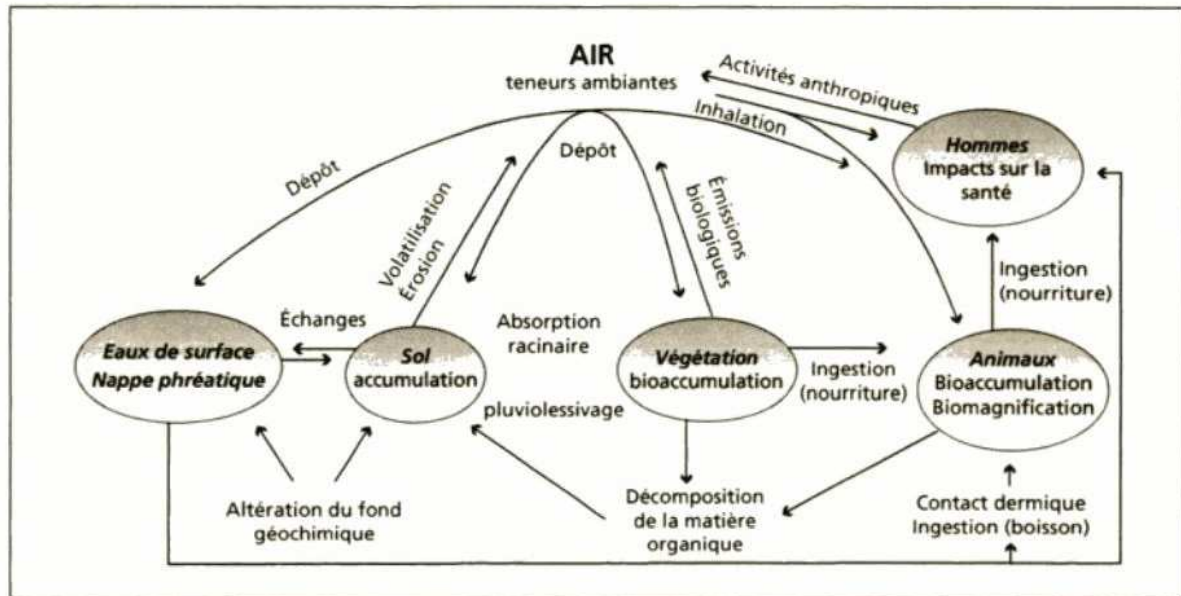


Figure 1.4 : Transfert des métaux dans l'environnement en milieu continental.

Source : Gombert *et al.*, 2005

En ce qui concerne les végétaux, les particules métalliques d'origine atmosphérique peuvent agir de différentes façons : elles peuvent causer des abrasions, réduire la photosynthèse, causer des blessures sur les feuilles ou encore s'intégrer à travers la cuticule (Grantz *et al.*, 2003). L'absorption métabolique via la rhizosphère est une autre voie probable et a un impact sur la végétation et les écosystèmes. Le dépôt direct de particules sur le sol peut influencer le cycle nutritif et avoir des effets sur les bactéries et les champignons de la rhizosphère. La biodisponibilité de cations alcalins et d'aluminium est dépendante du pH du sol qui peut être modifié de façon spectaculaire par des dépôts de particules de diverses classes (Grantz *et al.*, 2003).

De fortes contaminations atmosphériques en polluants ont été atteintes lors de la révolution industrielle, avec des conséquences visibles sur les végétaux (Chovin et Roussel, 1968). En effet, certains polluants peuvent revêtir pour les végétaux une gravité particulière : ce sont essentiellement le chlore et l'acide chlorhydrique qui provoquent des lésions analogues à

celles de la gelée, l'arsenic par déversement d'anhydride arsénieux, le zinc, et enfin les poussières de ciment de chaux ou de silice, capables de détruire toute végétation (Chovin et Roussel, 1968).

I.1.5. Effets sur la santé humaine

Les matrices contaminées inhalées et ingérées atteignent respectivement le système nerveux, le système respiratoire, le système digestif, le système auditif et le système sanguin, c'est-à-dire que pratiquement toutes les fonctions principales de l'organisme humain sont concernées (Ternisien, 1968).

Certains effets des métaux toxiques sur l'homme sont bien connus : le saturnisme désigne l'ensemble des manifestations de l'intoxication aiguë par le plomb. Les coliques de plomb sont les effets toxiques les plus connus du métal mais ses principaux organes cibles sont : le système nerveux, les reins et le sang. Le cadmium a été reconnu responsable de la maladie d'itaï-itaï (traduction : aïe-aïe !) qui est apparue dans les années cinquante dans des zones contaminées du Japon. Globalement, les métaux s'accumulent dans l'organisme et provoquent des effets toxiques à court et/ou à long terme. Ils peuvent affecter le système nerveux, les fonctions rénales, hépatiques, respiratoires, ou autres (**Tableau 1.2**).

D'autres travaux sur les effets de la pollution atmosphérique sur la santé humaine ont montré que l'exposition à des particules peut aggraver des maladies respiratoires ou cardiovasculaires chroniques, altérer les défenses immunitaires, endommager les tissus pulmonaires, entraîner une mort prématurée et éventuellement contribuer au cancer (Bernard *et al.*, 2001). Les effets sur la santé de l'exposition au monoxyde de carbone, au dioxyde de soufre et au dioxyde d'azote peuvent inclure une capacité au travail réduite, l'aggravation des maladies cardiovasculaires, des effets délétères sur la fonction pulmonaire, des maladies respiratoires, l'irritation des poumons et des modifications des systèmes de défense dans les poumons (Bernard *et al.*, 2001).

Tableau 1.2 : Impact des métaux sur la santé humaine
(synthèse de Marlière et al., 2002, Miquel, 2001, INRS, 2004)

Eléments	Toxicité/ Forme la plus toxique	Effets	
		Chroniques Exposition peu intense de longue durée	Aigus Exposition intense de courte durée
Arsenic	Formes inorganiques	Cancérogène, lésions (moelle osseuse, sang, foie, système nerveux)	Irritation des muqueuses, troubles digestifs et circulatoires, lésions de la peau
Cadmium	Formes inorganiques	Potentiellement cancérogène, ostéoporose, lésion du rein	Troubles digestifs, pulmonaires et rénaux
Chrome	Formes inorganiques	Effets cancérogènes (poumons), lésions du rein, troubles respiratoires et gastro-intestinaux	Irritation des muqueuses respiratoires
Cuivre	Toxicité rare sauf si exposition exceptionnelle		Lésion des muqueuses respiratoires et digestives (intestin et estomac)
Fer	Toxicité rare sauf si exposition exceptionnelle (trichlorure de fer)		Troubles digestifs, lésions du rein, irritation (peau, muqueuses)
Mercure	Méthylmercure	Troubles neurologiques et du comportement, tremblement	Troubles neurologiques et digestifs, irritation des voies respiratoires, lésions du rein
Nickel	Toxicité assez rare Forme organique (nickel tétracarbonyle)	Cancérogène, asthme, rhinites chroniques	Troubles respiratoires, digestifs et cutanés
Plomb	Formes inorganiques	Potentiellement cancérogène, plombémie, convulsion	Troubles neurologiques (enfants plus sensibles), digestifs et rénaux
Vanadium	Toxicité rare sauf si exposition exceptionnelle (peroxyde de vanadium)	Bronchite chronique, pneumonie, anémie, lésion du foie et des reins	Irritation (appareil respiratoire, peau, muqueuse)
Zinc	Toxicité rare sauf si exposition exceptionnelle (sels solubles, chlorure, phosphate et sulfate de zinc)		Irritation des muqueuses respiratoires, gastro-intestinales et cutanées, fatigue, frissons

I.2. Organisation française et internationale de la surveillance des métaux d'origine atmosphérique

I.2.1. Convention de Genève

L'historique de la Convention sur la pollution atmosphérique transfrontière à longue distance remonte aux années 60, époque à laquelle des scientifiques ont démontré qu'il y avait un rapport entre les émissions de soufre sur le continent européen et l'acidification des lacs scandinaves. La Convention a été le premier instrument international conçu pour protéger

l'environnement contre la menace croissante de pluies acides et de brouillards photo-oxydants. Adoptée en 1979, cette convention est entrée en vigueur en 1983. Huit protocoles ont suivi, qui exposent les engagements complémentaires pris par les Etats pour lutter contre la pollution atmosphérique.

Huit protocoles sont actuellement en vigueur : - l'un d'entre eux assure le financement à long terme du programme concerté de surveillance et d'évaluation (EMEP) ; - six autres régissent respectivement les émissions de soufre (deux protocoles), d'oxydes d'azote, de composés organiques volatils, de polluants organiques et des métaux lourds ; - finalement fin 1999, a été adopté à Göteborg, un nouveau protocole dit multi-polluants / multi-effets régissant quatre polluants responsables de l'acidification, de l'eutrophisation et de la pollution photochimique (ozone troposphérique principalement). Ce protocole relatif à des polluants et à effets multiples, dont l'élaboration repose sur des travaux scientifiques, techniques et économiques très complets (modélisation intégrée), représente un progrès majeur en matière de droit environnemental international.

- Le Programme concerté de surveillance contribue à la surveillance et à l'évaluation du transport à longue distance des polluants atmosphériques en Europe (EMEP). Il est mentionné dans le texte de la Convention. Le **"Protocole EMEP"** a été mis en place en 1984.
- le Protocole de 1985 sur le soufre (**"Protocole Soufre"**) établissait un taux de réduction uniforme, les Parties devant diminuer leurs émissions annuelles de 30%.
- Le Protocole de 1988 sur les oxydes d'azote (**"Protocole Oxydes d'azote "**), quant à lui, prévoyait que les Parties limiteraient leurs émissions tout en appliquant les meilleures techniques disponibles aux grandes sources nouvelles.
- Le protocole de 1994 relatif au soufre (second **"Protocole Soufre"**) a été le premier instrument, fondé sur les effets, à fixer des limites pour l'émission de polluants atmosphériques de façon à assurer la protection voulue de l'environnement au moindre coût pour les pays concernés.
- Deux protocoles ont été adoptés en 1998, portant sur des polluants atmosphériques qui n'étaient pas couverts par les précédents. Le Protocole de 1998 relatif aux métaux lourds (**"Protocole Métaux"**) concerne les problèmes environnementaux liés au transport à longue distance de ces métaux. Il est axé dans un premier temps sur le cadmium, le plomb et le mercure, mais prévoit la possibilité d'ajouter d'autres métaux lourds à cette liste, si besoin est. Ce protocole vise à réduire les émissions des trois métaux prioritaires, ayant pour origines les sources industrielles, la combustion et l'incinération de déchets. Le Protocole de 1998 relatif

aux polluants organiques persistants (POP) ("**Protocole POPs**"), quant à lui, vise à lutter contre la dissémination dans l'environnement de certains pesticides, certains produits chimiques industriels (comme les PCB) ou certaines substances (comme les dioxines) qui se forment spontanément lors de l'incinération des déchets et de la combustion.

- L'approche fondée sur les effets a été reprise dans le "**Protocole de Göteborg**" adopté en 1999, instrument qui porte sur plusieurs polluants et plusieurs effets. Il vise à combattre à la fois l'acidification, l'eutrophisation et l'ozone troposphérique, en fixant des plafonds d'émission pour quatre polluants : le soufre, les oxydes d'azote (NO_x), l'ammoniac et les composés organiques volatils (COV).

La Convention a été la première entente internationale à reconnaître à la fois les problèmes environnementaux et de santé causés par le mouvement transfrontalier des polluants atmosphériques et le besoin de solutions à l'échelle des continents.

Les mesures coopératives prises en vertu de la Convention ont beaucoup contribué au traitement du problème de la pollution atmosphérique en Europe et en Amérique du Nord. La réduction de plus du tiers des émissions de dioxyde de soufre en Europe s'est traduite par une grande amélioration de la qualité de l'air, et le rétablissement observé de la "santé" des écosystèmes.

I.2.2. Directives Européennes et LAURE

I.2.2.1. Directives Européennes

La nouvelle directive "Qualité de l'air" a été adoptée le 23 Avril 2008. Cette nouvelle directive sur la qualité de l'air est destinée à répondre à cette préoccupation en établissant des normes ambitieuses mais réalistes concernant la pollution due aux particules fines PM_{2.5} dans l'Union européenne".

La directive européenne "Qualité de l'air" vise à réduire les concentrations de particules fines. La directive fusionne quatre autres directives et une décision du Conseil en une unique directive sur la qualité de l'air. Elle fixe des normes et des dates butoir pour la réduction des concentrations de particules fines, qui, au même titre que les particules plus grosses connues

sous le code PM10 et déjà réglementées, comptent parmi les polluants les plus dangereux pour la santé humaine.

En vertu de cette directive européenne "Qualité de l'air", les États membres seront tenus de réduire, d'ici à 2020, l'exposition aux PM2.5 en zone urbaine, de 20 % en moyenne par rapport aux chiffres de 2010. Elle impose de ramener les niveaux d'exposition au-dessous de 20 µg/m³ d'ici 2015 dans ces zones.

Sur l'ensemble de leur territoire, les États membres devront respecter le plafond de 25 µg/m³ fixé pour les PM2.5. Cette valeur cible doit être atteinte en 2015 ou, dans la mesure du possible, dès 2010.

De plus, la nouvelle directive européenne "Qualité de l'air" établit de nouveaux objectifs en ce qui concerne les particules fines PM2.5 sans modifier les normes de qualité de l'air existantes. Elle accorde cependant "aux États membres une plus grande souplesse pour le respect de certaines de ces normes dans les secteurs où cela leur est difficile. Vingt-cinq des vingt-sept États membres de l'Union européenne éprouvent en effet des difficultés à respecter les plafonds applicables aux PM10, qui sont dépassés dans au moins une partie de leur territoire."

Les délais d'application des normes PM10 peuvent être reportés de trois ans à compter de l'entrée en vigueur de la directive (soit mi-2011), ou de cinq ans au maximum pour le dioxyde d'azote et le benzène (2010-2015), pourvu que la législation communautaire applicable, en matière par exemple de prévention de la pollution industrielle et de lutte contre cette pollution (IPPC) soit pleinement mise en œuvre, et que toutes les mesures appropriées de lutte antipollution soient prises. La directive dresse une liste des mesures à envisager à cet égard.

La nouvelle directive sur la qualité de l'air est l'une des mesures phares de la stratégie thématique en matière de pollution atmosphérique adoptée par la Commission en septembre 2005. La directive a été publiée au Journal officiel de l'UE en mai 2008.

I.2.2.2. Loi LAURE (Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie)

Codifiée aux articles L220-1 et suivant du Code de l'Environnement, cette loi cadre, parue le 30 décembre 1996 vise à rationaliser l'utilisation de l'énergie et à définir une politique publique intégrant l'air en matière de développement urbain. Le droit de respirer un air qui ne nuise pas à sa santé est reconnu à chacun. Cette loi est répertoriée dans le code de l'environnement.

La loi rend obligatoire :

- la surveillance de la qualité de l'air,
- la définition de normes de qualité de l'air (objectifs de qualité, valeurs limites ...),
- l'information du public.

La surveillance porte sur l'ensemble du territoire national depuis le 1er janvier 2000. Une information du public, dont l'Etat est le garant, doit être réalisée périodiquement et une alerte doit être déclenchée en cas de dépassement de seuil. L'Etat délègue ses missions de surveillance à des organismes agréés "équilibrés" regroupant 4 collèges (Etat, collectivités territoriales, industriels, associations). Pour garantir la qualité des mesures, l'Etat a mis en place le Laboratoire Central de Surveillance de la Qualité de l'Air (INERIS, LNE, Ecole des Mines de Douai).

Elle prescrit l'élaboration d'un Plan Régional de la Qualité de l'Air (PRQA), de Plans de Protection de l'Atmosphère (PPA) et pour les agglomérations de plus de 100 000 habitants d'un Plan de Déplacement Urbain (PDU). Le PDU vise à développer les transports collectifs et les modes de transport propres, à organiser le stationnement et à aménager la voirie. Des itinéraires cyclables devront être réalisés à l'occasion de réalisation ou de rénovation de voirie.

Elle instaure une procédure d'information et d'alerte à deux niveaux, gérée par le Préfet. Celui-ci doit informer le public et prendre des mesures d'urgence en cas de dépassement du seuil d'alerte (restriction des activités polluantes, notamment de la circulation automobile).

Elle intègre les principes de pollution et de nuisance dans le cadre de l'urbanisme et dans les études d'impact relatives aux projets d'équipement.

Elle définit des mesures techniques nationales pour réduire la consommation d'énergie et limiter les sources d'émission, instaure des dispositions financières et fiscales (incitation à l'achat de véhicules électriques, GPL ou GNV, équipement de dispositifs de dépollution sur les flottes de bus).

I.2.3. Surveillance des teneurs ambiantes

Au niveau national, l'obligation de surveillance de la qualité de l'air est transposée en droit français par la Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie (LAURE, 30/12/96) décrite dans le paragraphe précédent. Cette surveillance contribue au développement des connaissances et répond au droit de chacun -institué par la LAURE- de connaître la qualité de l'air qu'il respire.

L'arrêté du 15 février 2000 concernant les installations classées pour la protection de l'environnement soumises à autorisation, renforce les dispositions sur les rejets atmosphériques de métaux toxiques (cadmium, mercure, thallium et plomb), notamment en abaissant les valeurs limites d'émission.

Le Conseil national de l'Air (avis du 27 février 2001), recommande, quant à lui, de développer les connaissances sur les mécanismes de transfert des polluants (notamment cadmium, mercure et plomb) du sol vers l'homme, et sur la biodisponibilité pour l'homme et les végétaux. Il préconise ainsi de poursuivre la surveillance de ces métaux dans l'air ambiant, y compris à l'aide de bioindicateurs.

Au niveau local et régional et dans le cadre de LAURE, la surveillance de la qualité de l'air est assurée, pour le compte de l'Etat, par 38 associations agréées pour la surveillance de la qualité de l'air (AASQA) (dont l'ASCOPARG est un exemple). Dans le cadre d'une coordination nationale et technique assurée par l'ADEME, ces associations permettent de répondre aux obligations réglementaires liées aux directives en matière de connaissance des niveaux de polluants dans l'air (SO₂, O₃, NO_x, PM₁₀, CO, benzène...).

En ce qui concerne les métaux, les AASQA mesurent le plomb en routine depuis de nombreuses années (82/884/CE ; 99/30/COD). La **Figure 1.5** montre la répartition des différentes AASQA en France.

En région Rhône-Alpes, 6 AASQA existent : AMPASEL, ASCOPARG, ATMO Drôme-Ardèche, COPARLY, AIR DE L'AIN ET DES PAYS DE SAVOIE et SUP'AIR.



Figure 1.5 : Carte de répartition des associations agréées pour la surveillance de la qualité de l'air (AASQA) en France. Source : Atmo France (www.atmo.france.org)

I.2.3.1. L'ASCOPARG (Association pour le Contrôle et la Préservation de l'Air en Région Grenobloise)

La surveillance quotidienne de la qualité de l'air dans l'agglomération grenobloise est assurée par l'ASCOPARG (Association pour le Contrôle et la Préservation de l'Air en Région Grenobloise) grâce à un réseau de 10 stations de mesures, dont 3 spécifiquement urbaines, 3 consacrées au trafic, 1 consacrée au suivi industriel, 2 situées en zone périurbaine. En dehors de l'agglomération, ce dispositif est complété par 2 stations sur la Vallée de la Romanche, 1 station rurale à Charavines et 1 à Voiron. En cas de dépassement des valeurs réglementaires qui nécessitent l'information de la population, la Préfecture met en place 2 types de

dispositions : (1) pour le dioxyde de soufre, une obligation pour les industriels de recourir à des combustibles moins polluants, (2) pour les dioxydes d'azote, dioxydes de soufre et l'ozone, une limitation de la vitesse sur les voies rapides (passage de 90 à 70 km/h).

La mission principale de l'ASCOPARG réside dans la production de données élémentaires de qualité de l'air qui comprend d'une part la gestion d'un réseau de stations permanentes de surveillance en continu de la qualité de l'air et l'organisation de campagnes de mesures temporaires, et, d'autre part, la mise en oeuvre de modèles de prévision, de spatialisation ou de diagnostic fournissant des données estimées dans le temps et/ou dans l'espace. La diffusion de données commentées est réalisée pour les situations d'alerte et, pour l'information permanente, sous forme de bulletins et de bilans récapitulatifs en référence aux normes ainsi que, plus largement, sous forme d'études diverses sur les phénomènes de pollution, les impacts des activités...etc.

En ce qui concerne les métaux lourds, les 6 métaux cités dans la directive européenne du 15 décembre 2004 (2004/107/CE) (arsenic, cadmium, nickel, plomb, zinc et chrome) sont suivis en continu sur le territoire de l'ASCOPARG depuis 2003, sur le site urbain de Grenoble "Les Frênes". Depuis le début des mesures, on ne constate aucun dépassement des normes pour les concentrations de ces six métaux.

I.2.3.2. L'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie)

L'ADEME participe à la mise en oeuvre des politiques publiques dans les domaines de l'environnement, de l'énergie et du développement durable. Afin de leur permettre de progresser dans leur démarche environnementale, l'agence met ses capacités d'expertise et de conseil à disposition des entreprises, des collectivités locales, des pouvoirs publics et du grand public. Elle aide, en outre, au financement de projets, de la recherche à la mise en oeuvre, et ce, dans les domaines suivants : la gestion des déchets, la préservation des sols, l'efficacité énergétique et les énergies renouvelables, la qualité de l'air et la lutte contre le bruit.

Outre sa collaboration à l'élaboration des réglementations, l'Agence contribue à l'évolution du dispositif national de mesure et de surveillance de la qualité de l'air. Elle encourage la réduction et la prévention des émissions de polluants atmosphériques, en agissant, à la fois sur les sources fixes (activités industrielles ou agricoles, habitat) et sur les sources mobiles (transport routier, aérien, maritime) de ces émissions.

I.2.3.3. Les DREAL (Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement)

La DREAL, Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement a été créée le 2 mars 2009. Elle est issue de la fusion de la DRE (Direction Régionale de l'Équipement), de la DIREN (Direction Régionale de l'Environnement) et de la DRIRE (Direction Régionale de l'Industrie, de la Recherche et de l'Environnement) dont elle reprend les missions (hormis le développement industriel et la métrologie).

La DREAL est désormais le service régional qui porte la politique nationale de lutte contre le changement climatique, de préservation de la biodiversité, de lutte contre les risques, mais aussi la politique nationale du logement et de renouvellement urbain, dans une approche intégrée d'aménagement et de développement durable. La DREAL assure le pilotage, en région, des politiques des ministères chargés du développement durable, du logement et de la ville. Outre ses missions dans les domaines de l'aménagement du territoire, des infrastructures, des transports, de la préservation de l'environnement et de la réduction des risques, elle contribue à l'amélioration de l'offre de logements et oeuvre pour la rénovation urbaine et la lutte contre l'habitat indigne.

I.2.4. Surveillance des dépôts

Des études réalisées en France, qu'elles soient ponctuelles et locales ou bien récurrentes et nationales, permettent de mesurer les niveaux de dépôt en métaux. Ces études mesurent le dépôt, soit de manière directe (par mise en place de collecteurs proches du sol), soit de manière indirecte (par accumulation dans les sols, sédiments, neiges, organismes vivants...). Les mesures réalisées par les dispositifs nationaux de surveillance sont adaptées à l'estimation de la distribution spatiale des dépôts et de leur évolution temporelle. En France, trois dispositifs de surveillance mesurent les niveaux de fond des dépôts atmosphériques et renseignent sur le transport à grande distance. Leurs données sont transmises à diverses instances européennes (**Tableau 1.3**). Le dispositif MERA, créé en 1984, a été mis en place pour suivre en milieu rural les retombées atmosphériques sous forme de précipités, de gaz et d'aérosols. Les polluants, mesurés en une dizaine de stations, concernent les problématiques d'acidification et d'eutrophisation, de pollution photo-oxydante (ozone, composés organiques volatils, oxydes d'azote) sur quelques stations et des métaux sur une station (Peyrusse-Vielle). Des mesures météorologiques viennent compléter l'ensemble de ces mesures.

Tableau 1.3 : Dispositifs de surveillance des retombées atmosphériques en pollution de fond (MERA, CATAENAT et "mousses/métaux"). Source : Gombert et al., 2005

	MERA	CATAENAT	Mousses/métaux
Objectifs	Evaluer quantitativement la pollution atmosphérique de fond de longue distance	Etablir des connaissances sur l'impact des retombées sur les écosystèmes forestiers, notamment les sols et les déséquilibres nutritifs	Estimer les dépôts métalliques relatifs par l'analyse des concentrations en métaux dans les mousses
Pilotage	ADEME/Ecole des Mines de Douai	Office National des Forêts	Muséum national d'histoire naturelle
Nombre de sites	10	27	528
Date de création	1984	1992	1996
Echantillon (dépôt)	Précipitations*, aérosols, gaz (dépôts humides)	Précipitations*, solutions de sol, humus (dépôt humide et total)	Mousses terrestres (dépôt total)
Périodicité d'échantillonnage	Journalière (et bimensuelle pour les métaux)	Hebdomadaire	Quinquennale
Périodicité d'analyse	Journalière	Mensuelle	Quinquennale
Analyses (ions majeurs)	Précipitations, pH, conductivité, K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , $N-NH_4^+$, $N-NO_3^-$, Cl^- , $S-SO_4^{2-}$	Précipitations, pH, conductivité, alcalinité/acidité, dépôt sous couvert forestier (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , $N-NH_4^+$, $N-NO_3^-$, Cl^- , $S-SO_4^{2-}$)	K, Mg, Ca, Na, P...
Autres polluants (dont métaux)	SO ₂ , soufre particulaire, O ₃ , NO _x , composés organiques, Hg gazeux, NH ₃ , NH ₄ particulaire, Hg (pluies), Pb, Cd, As, Cu, Zn, Ni et Cr (aérosols et pluies)	Pluiolessivats, ruissellements des troncs, solution des sols (majeurs + Al, Fe, Mn), sols et humus (majeurs + Cd, Cu, Ni, Pb, Zn)	As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, V, Zn (+ autres)

*Précipitations : pluie, neige, givre, grêle, rosée...

Le dispositif CATAENAT, qui fait partie du réseau RENECOFOR, permet sur 27 placettes forestières de mesurer les dépôts atmosphériques en éléments majeurs (dépôt total). Mis en place en 1992, ce dispositif permet d'améliorer les connaissances sur l'impact des dépôts atmosphériques sur les écosystèmes forestiers français, par le biais notamment de l'acidification des sols et des déséquilibres nutritifs. Certains métaux traces sont mesurés dans ce cadre.

Le dispositif "mousses/métaux" mis en place en France en 1996, a fait l'objet à ce jour de trois campagnes de mesures (1996, 2000 et 2006). Ce dispositif, avec plus de 500 sites, permet d'estimer les dépôts relatifs en métaux et éléments traces par analyse de Bryophytes (dépôt total). Il est lié à un programme européen de mesures démarré dans les pays nordiques au début des années 1980 et maintenant géré par le Programme Inter-Communautaire (PIC) Végétation.

Dans le cadre d'un suivi régulier au niveau national, le suivi des niveaux de fond des retombées métalliques se limite encore à quelques sites pérennes instrumentés, comme les stations françaises de Prospoder et Peyrusse-Vielle dans le cadre des réseaux européens OSPAR et EMEP. Le dispositif RENECOFOR/CATAENAT permet lui aussi un suivi de certains métaux dans les solutions de sol (17 sites), les sols (11 sites) et les humus (23 sites), mais la part atmosphérique du dépôt est difficile à distinguer en raison des quantités importantes présentes dans les sols. On citera également la station de Vouzon (localisée à proximité d'un site RENECOFOR) mise en place dans le cadre de la campagne "mousses/métaux" pour étudier la relation de transfert des métaux de l'atmosphère vers les mousses. Cette station de fond mesure les dépôts atmosphériques totaux avec une fréquence hebdomadaire depuis 2000 (Colin *et al.*, 2004).

I.3. Les métaux lourds dans les écorces d'arbres

I.3.1. Les éléments nutritifs d'origine biogénique

La matière vivante, vue globalement, est constituée d'éléments majeurs (carbone, hydrogène, oxygène, azote, soufre, phosphore), d'éléments mineurs (calcium, sodium, potassium, magnésium) et d'oligoéléments (fer, zinc, cuivre, manganèse...) (Markert et Weckert, 1993 ; Bargagli, 1998a et b). Les êtres vivants, suivant leur appartenance à différents niveaux trophiques (autotrophes vis-à-vis du carbone, de l'azote et du phosphore ; hétérotrophes saprophytes, prédateurs ou parasites) obtiennent les éléments nécessaires à l'établissement de leur structure et à leur fonctionnalité de l'air, de l'eau, du sol ou d'autres êtres vivants ou morts. Des apports excessifs d'un de ces éléments ont pu découler de situations spécifiques, en particulier des activités anthropiques. Ainsi, des déversements excessifs de phosphore et d'azote nitrique ou ammoniacal ont-ils été et sont encore à l'origine de processus d'eutrophisation, spécialement des écosystèmes aquatiques calmes (Tilman, 1999 ; Rabalais, 2002 ; Chambers *et al.*, 2008).

I.3.2. Les métaux lourds

Les métaux lourds sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, mais en général en quantités très faibles. On dit que les métaux sont présents "en traces". Par ailleurs, ils sont aussi "la trace" du passé géologique et de l'activité de l'homme, si bien que le

mot "trace" introduit une double signification assez intéressante ici. La classification en métaux lourds est d'ailleurs souvent discutée car certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement "lourds" (par exemple : le zinc), tandis que certains éléments toxiques ne sont pas tous des métaux (l'arsenic par exemple). Pour ces différentes raisons, la plupart des scientifiques préfèrent à l'appellation métaux lourds, l'appellation "éléments en traces métalliques" -ETM- ou par extension "éléments traces" (Duffus, 2002).

Certains métaux se retrouvent souvent à l'état de traces, indispensables au métabolisme car cofacteurs enzymatiques (et d'autres non : le plomb, le mercure et le cadmium par exemple). Au delà d'un certain seuil dit "seuil de tolérance", les métaux non utiles pour le vivant entraînent des effets biochimiques ou physiologiques néfastes et sont considérés comme toxiques. Certains d'entre eux ont des propriétés cancérogènes et mutagènes. Les principaux métaux lourds porteurs de toxicité sont le cadmium, le chrome, le cuivre, le plomb, le mercure, le nickel, le sélénium, l'arsenic (métalloïde), et l'argent. Les métaux lourds peuvent être fixés sur des particules minérales (en particulier argileuses) et sur la matière organique (colloïde électronégatif capable d'adsorber des cations). Certains métaux initialement solubilisés dans l'eau peuvent précipiter sous forme moins hydrosoluble d'oxydes, d'hydroxydes, de carbonates, de phosphates, ou de sulfures. Les métaux adsorbés sur la matière minérale et/ou organique réalisent un équilibre entre la forme libre (atmosphérique ou aqueuse) et la forme adsorbée. Mais la moindre perturbation de l'environnement (par exemple l'eau de pluie) peut remobiliser ces métaux. Différents mécanismes sont à l'origine de ce phénomène : réactions d'oxydoréduction, activité biologique, présence de chélateurs, ou perturbations physico-chimiques (Martin-Dupont *et al.*, 2006).

I.3.3. Les micropolluants organiques

Dans tous les compartiments de la biosphère telle qu'elle se présente à l'ère quaternaire, la présence d'éléments minéraux divers s'accompagne de celle de matière organique d'origines très variées. Du fait du développement par l'homme d'une chimie organique de synthèse d'une intensité et d'une diversité impressionnantes au cours du XX^{ème} siècle (Lewis, 1985), des polluants issus de cette activité ont été déversés dans l'atmosphère et s'y sont distribués à l'échelle de la planète. Ces polluants dits "majeurs" par la dangerosité des molécules déversées, par leur stabilité et par l'importance quantitative des déversements,

peuvent être très sommairement classés en quelques groupes : produits industriels (peintures, huiles, PCB, solvants...), produits organiques issus des combustions (HAP, dioxines...), pesticides, médicaments.

Parfois, le polluant peut être un composé d'origine anthropogénique contenant en même temps un métal et une partie organique qui lui est fortement liée (plomb tétraéthyle, tributyltain, manèbe, zinèbe, mancozèbe...) (Jeltes, 1969 ; Dmitriev *et al.*, 1983 ; Afsar et Demirata, 1987).

Tous les composés mentionnés ci-dessus, issus de l'atmosphère peuvent se retrouver en quantités variables dans les écorces d'arbres.

I.3.4. Bioindication et bioaccumulation

Différents êtres vivants sur les troncs des arbres ont été utilisés comme bioindicateurs (De Bruin et Hackeniz, 1986 ; Walkenhorst *et al.*, 1993 ; Bargagli, 1998a ; Asta *et al.*, 2002 ; Garrec et Van Haluwyn, 2002). Les lichens sont d'excellents bioindicateurs de la pollution atmosphérique avec la disparition de certaines espèces sensibles face à certains polluants tels que SO₂ (Hawksworth et Rose, 1970 ; Hawksworth, 1973 ; Belandria *et al.*, 1989). D'autres espèces de lichens sont résistantes aux polluants et sont utilisées comme bioaccumulateurs (Bargagli, 1998b ; Freitas *et al.*, 1999 ; Garty, 2001 ; Wolterbeek *et al.*, 2003). De multiples travaux ont été conduits à l'aide des lichens dans de nombreux pays (Leblanc et De Sloover, 1970 ; Trass, 1973 ; Van Haluwyn et Lerond, 1986 ; Wirth, 1988 ; Herzig *et al.*, 1989 ; Seaward, 1989 ; Van Dobben et Ter Braak, 1998 ; Nimis, 1999 ; Freitas *et al.*, 2001 ; Jeran *et al.*, 2002). Les mousses épiphytes ont été également largement utilisées (Winner, 1988 ; Tyler, 1990 ; Rühling, 1994 ; Steinnes, 1995 ; Galsomies *et al.*, 1999 ; Berg *et al.*, 2003 ; Harmens *et al.*, 2004 ; Gombert *et al.*, 2005 ; Freitas *et al.*, 2006a).

I.3.5. Utilisation des écorces comme bioaccumulateurs

La partie superficielle de l'écorce des arbres (rhytidome) est produite par l'activité de l'assise subéro-phellodermique qui fournit principalement du suber (ou liège) (Matériel et méthodes et Chapitre V). A l'origine, les premières études sur les écorces étaient liées à celle des lichens. L'acidité de l'écorce a un effet sur la présence de lichens épiphytes sur les troncs et les branches des arbres (Barkman, 1958). L'écorce a été employée comme un indicateur de la pollution de l'air, après qu'il ait été constaté une corrélation entre l'acidité de l'écorce et les

concentrations atmosphériques de SO₂ (Staxäng, 1969 ; Grodzinska, 1971 ; Wolterbeek *et al.*, 1996 ; Böhm *et al.*, 1998 ; Schulz *et al.*, 1999). L'écorce a été utilisée dans des études régionales sur les isotopes du soufre et de l'azote (Takala *et al.*, 1991 ; Schulz *et al.*, 2001). L'écorce absorbe également les métaux lourds, elle a ainsi été utilisée pour étudier les émissions de métaux lourds provenant de la circulation automobile (Laaksovirta *et al.*, 1976 ; Lötschert et Köhm, 1978) et de l'industrie (Barnes, 1976 ; Świeboda et Kalembe *et al.*, 1979). Les émissions de métaux lourds provenant des activités industrielles ont été étudiées autour de sources d'émissions ponctuelles (Symeonides, 1979 ; Kansanen et Venetvaara 1991), ainsi que dans les zones industrielles (Türkan *et al.*, 1995 ; Schulz *et al.*, 1999). Des études conduites sur les émissions de plomb provenant du trafic ont montré que la concentration en plomb dans l'écorce était corrélée avec, par exemple, la densité de la circulation (Hampp et Holl, 1974 ; Ward *et al.* 1974 ; Laaksovirta *et al.*, 1976), les concentrations atmosphériques de CO, et qu'elle était négativement corrélée avec la concentration de manganèse dans l'écorce (Lötschert et Kohm, 1978). Dans certaines études réalisées en zones urbaines, il a été trouvé que les concentrations de métaux lourds dans l'écorce étaient plus élevées dans les zones industrielles et dans les centres-villes (Lötschert et Kohm 1978 ; Karandinos *et al.*, 1985). Le développement des techniques d'analyse au cours des dernières années a fait que certains éléments présents dans l'écorce à de très faibles concentrations ont également pu être étudiés, par exemple, les éléments qui sont libérés dans l'atmosphère à partir de trafic (par exemple, le plomb et le zinc sont issus des gaz d'échappement, de l'usure des garnitures de freins, des pneumatiques et de la corrosion des glissières de sécurité ; les freins constituent une source importante de cuivre) (Forget, 1994 ; Maatoug *et al.*, 2007), ainsi que des éléments radioactifs (Bellis *et al.*, 2000, 2001a, b et c).

Au cours de la dernière décennie, l'utilisation des écorces pour le suivi des polluants atmosphériques est devenue un outil beaucoup plus polyvalent. Des analyses statistiques ont été utilisées pour déterminer, par exemple, la source des métaux lourds et d'autres polluants dans l'écorce (Kuik et Wolterbeek, 1994 ; Böhm *et al.*, 1998). Des modèles ont même été utilisés pour calculer, sur la base des concentrations des éléments dans l'écorce de pin, le niveau de dépôt de sulfate, d'ammonium, de nitrate, de calcium et de fer dans les forêts de pins (Schulz *et al.*, 1997). La variation temporelle des concentrations de métaux lourds et d'un certain nombre de polluants dans l'écorce des arbres a également été étudiée, dans l'industrie et les anciennes zones industrielles en cours de réhabilitation (Schulz *et al.*, 1999). Satake *et al.*, (1996) et Bellis *et al.*, (2002 et 2004) ont travaillé sur la concentration en plomb dans les "bark pockets" (ou poches d'écorce), formées il y a 186 - 255 ans, chez des cèdres du Japon

(*Cryptomeria japonica*), et ont comparé les concentrations de celles de la même espèce dans les années 1990.

L'écorce de plus de 40 espèces d'arbres différentes a été utilisée dans des études de biosurveillance en Europe. Les espèces d'arbres les plus couramment utilisées sont : *Acer platanoides*, *Aesculus hippocastanum*, *Fraxinus excelsior*, *Quercus robur*, *Tilia cordata*, *Picea abies* et *Pinus sylvestris*. Les études sur l'utilité des différentes méthodes de biosurveillance ont augmenté dans le centre de l'Europe en particulier, où avec la forte densité de population, il est difficile d'obtenir des matrices biologiques. Comme l'écorce est généralement facilement disponible, même dans les zones les plus densément peuplées, elle a été jugée comme une matrice très utile, par exemple, dans les zones urbaines.

Pour la contamination métallique, l'utilisation des écorces a été fructueuse (Saarela *et al.*, 2005 ; Mandiwana *et al.*, 2006 ; Tye *et al.*, 2006 ; Ayrault *et al.*, 2007a ; Shin *et al.*, 2007) et plusieurs espèces d'arbres sont communément utilisées : *Pinus nigra* ou *P. sylvestris* (Huhn *et al.*, 1995 ; Schulz *et al.*, 1999 ; Haapala & Kikuchi, 2000 ; Narewski *et al.*, 2000 ; Harju *et al.*, 2002 ; Saarela *et al.*, 2005), *Olea europaea* (Pacheco *et al.*, 2001 ; 2002, 2004a and b ; Freitas *et al.*, 2003), *Platanus hybrida* (Freitas *et al.*, 2006b), *Fagus silvatica* (Bellis *et al.*, 2004), *Betula sp.* (Herman, 1992) et *Populus nigra* (Berlizov *et al.*, 2007) et représentent souvent une grande proportion de la couverture végétale. Ainsi, une quantité d'écorce appropriée pour l'analyse peut-elle être prélevée sans altérer la physiologie de l'arbre.

I.3.6. Les facteurs qui influent sur les concentrations élémentaires dans l'écorce

L'écorce des arbres se compose schématiquement d'une couche interne (parenchyme, fibres et phloème), d'une couche de formation de la couche de liège (assise subérophellodermique), et d'une couche externe importante, composée de cellules mortes de liège (ou suber) (Srivastava 1964 ; Prance *et al.*, 1993). Cette couche de liège mort a été employée dans des études de biosurveillance. La qualité de l'écorce varie en fonction de la composition des parois des cellules de suber et l'épaisseur des couches interne et externe de l'écorce. Il existe des différences considérables de composition chimique de l'écorce entre les différentes espèces d'arbres (Barkman, 1958).

Ainsi, il apparaît que l'accumulation des polluants atmosphériques dans l'écorce est soumise à des processus physiologiques, chimiques et physiques très complexes qui débouchent sur une réponse globale n'autorisant qu'une interprétation difficile sur l'origine. Les polluants s'accumulent passivement à la surface de l'écorce et peuvent être absorbés soit par le biais de

processus d'échange d'ions dans les zones externes de la couche de cellules mortes de suber (Walkenhorst *et al.*, 1993 ; Schulz *et al.*, 1997), soit par une intégration physique dans le suber (Zhang *et al.*, 2008). Par exemple, le soufre s'accumule dans l'écorce sous la forme d'acide sulfurique (H_2SO_4), dont la majorité réagit ensuite avec le calcium pour former du gypse (CaSO_4) (Kreiner, 1986). Heichel et Hankin (1972) ont signalé dès le début des années 1970 que les particules contenant du plomb provenant des émissions de la circulation aux États-Unis sont principalement situées à la surface des tissus de l'écorce, et que leur taille varie de 3 à 13 μm . L'acidité de l'écorce a un effet sur les concentrations de certains métaux lourds. Par exemple, dans une étude portant sur la présence de lichens épiphytes sur le chêne et le frêne, Bates et Brown (1981) ont trouvé une corrélation négative entre le pH de l'écorce et la concentration en Fe. Ils concluent que cette corrélation est due à l'augmentation de la mobilité du Fe lorsque le pH de l'écorce diminue.

La migration des éléments de la surface de l'écorce, du suber vers les tissus du bois, ou l'inverse, est considérée comme non significative par Trüby (1988) et Schulz *et al.* (1997). En outre, la migration des métaux lourds issus du sol via l'absorption racinaire et le transfert vers l'écorce en cours de formation a été considérée comme négligeable par Trüby (1988).

La structure physique de la surface de l'écorce a une influence considérable sur l'accumulation passive des éléments. Une surface rugueuse (ex : pin) accumule plus facilement les polluants atmosphériques qu'une surface lisse (ex : hêtre). Cela est dû au piégeage des particules qui est favorisé par les crevasses présentes dans le suber. Cependant, la réalisation d'une datation des polluants intégrés dans ce type d'écorce semble très complexe. L'étude réalisée par Szopa *et al.*, (1973) sur les concentrations en plomb le long des routes aux États-Unis a indiqué que la concentration de plomb dans l'écorce réagit rapidement aux changements marqués dans les concentrations de plomb dans l'atmosphère. Il s'agit donc ici d'une biosurveillance sur des pas de temps relativement courts.

En général, les concentrations élémentaires dans l'écorce des arbres à feuilles caduques sont beaucoup plus élevées que celles des écorces de conifères (Rasmussen 1978). Karandinos *et al.*, (1985), Schulz *et al.*, (1997) constatent que les concentrations sont les plus élevées dans les couches superficielles de l'extérieur de l'écorce, et diminuent rapidement vers les couches internes de l'écorce. Des variations de concentrations le long de la tige ont également été démontrées (Barnes *et al.*, 1976). Dans une étude réalisée par Kosmus et Grill (1986) à Graz, en Autriche, le microclimat (phénomène d'inversion thermique) a eu un effet significatif sur les quantités de polluants déposées et, par la même occasion, sur les concentrations élémentaires dans l'écorce.

L'ensemble des références mentionnées ci-dessus tend à démontrer que les écorces d'arbres constituent une matrice de grande importance pour étudier les dépôts atmosphériques mais, aussi, qu'il s'agit d'une matrice complexe dont la réactivité n'est que très partiellement connue.

I.4. Objectif de la recherche

Comme dans le cas de la surveillance des eaux potables phréatiques et de surface, une surveillance de la contamination de l'air s'est progressivement mise en place. Elle fait actuellement l'objet d'une démarche multiple visant à bien connaître et améliorer la situation. Cette démarche consiste à : 1) identifier les polluants atmosphériques présents, 2) les quantifier régulièrement, 3) analyser les processus d'émission, de distribution, de transformation et d'impact pour la planète, le climat et le vivant, 4) définir les stratégies susceptibles de réduire voire annuler les polluants dangereux, 5) évaluer les résultats obtenus et à qualifier, par la modélisation, les tendances globales. Cette stratégie se fonde sur la coordination de trois effecteurs : 1) l'Etat, en activité associative avec la communauté Européenne formule une "loi sur l'air" (Loi n° 96-1236 du 30/12/96 sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie, Journal Officiel du 1er janvier 1997) qui définit le champ de ce qui est autorisé et de ce qui ne l'est pas, avec une capacité d'intervention basée sur ses agences et services (ADEME, DREAL). Le suivi précis des situations régionales et départementales est assuré par ; 2) un réseau national d'associations agréées, reconnues d'utilité publique, dont, pour l'Isère l'ASCOPARG est l'exemple type et 3) des laboratoires de recherche essentiellement publics mais pouvant également faire partie de grandes firmes industrielles qui assurent le travail d'analyse et d'évaluation. Cette stratégie, qui fonctionne depuis plusieurs décennies a déjà porté ses fruits et permis des progrès essentiels dans la connaissance des processus (par exemple, la contamination des glaces au niveau des pôles, témoin de procédures de transfert à grandes distances des polluants (Bargagli, 2000 ; Sanchez-Hernandez, 2000 ; Choi *et al.*, 2008)), dans l'induction de réduction des émissions (contrôle des établissements industriels par la DREAL), l'interdiction d'usage de certains composés (nombreux organochlorés, pyralène, fluorocarbones, amiante, plomb tétraéthyle...), la mise au point de procédures d'alerte (ozone...), l'innovation concernant les filtres des incinérateurs, les pots d'échappement des voitures, etc... Cependant, la capacité de contrôle de la composition atmosphérique, base du système, ne peut être ni généralisée spatialement, ni

être constante. On a donc compris depuis les années 70 (Barnes *et al.*, 1976) que l'étude de matrices capables de cumuler des dépôts atmosphériques pouvait apporter une information précise, à la fois sur la distribution spatiale cumulée des polluants (pouvant mener à la détection des zones à risque) et sur la nature et l'intensité du dépôt sur des pas de temps longs. C'est ainsi que les méthodes de bioindication et de bioaccumulation évoquées précédemment se sont développées, pratiquement depuis les années 70, avec des lichens, des mousses, des écorces et des cernes d'arbres. Ces pratiques ont rapidement donné des résultats qui ont débouché sur des suivis utilisables pour les pouvoirs publics, en particulier dans les procédures d'étude d'impact. Le paradoxe de cette situation est que l'utilisation a précédé et, en quelque sorte dénaturé l'explication en s'installant dans un empirisme qui avait l'avantage apparent de la simplicité. Donner à cette pratique un vrai contenu scientifique devenait ainsi souhaitable. Nos premières approches ont montré que les processus de dépôt, d'accumulation, de transit interne, de mélange avec les éléments biologiques structurels étaient, dans une écorce d'arbre, d'une très grande complexité, et, de plus, évidemment dépendant de l'espèce de végétal considérée et de son âge.

C'est là que se situe l'origine de cette thèse qui se veut fondamentalement méthodologique et apte à créer les bases solides de nouveaux progrès dans l'usage de la bioindication et de la bioaccumulation des polluants atmosphériques élémentaires par les arbres, en accord avec le titre de ce manuscrit.

Le principal objectif était d'étudier les dépôts de polluants atmosphériques dans la cuvette grenobloise, zone enclavée propice au cumul de polluants atmosphériques, en utilisant différentes matrices, dont l'écorce des arbres que nous avons étudiée dans le détail. On pouvait attendre de cette étude qu'elle puisse permettre d'élaborer une méthode fiable et peu coûteuse d'évaluation du niveau de pollution atmosphérique inorganique d'un site, d'une part sur des pas de temps longs (étude chronologique), et d'autre part sur de longues distances (étude cartographique).

Cette étude fait suite aux travaux coordonnés par Jean-Luc Jaffrezo, de 2000 à 2005, dans le cadre du programme POVA (Pollution des Vallées Alpines) auquel notre équipe a participé.

Les différents travaux de cette thèse, dont les résultats ont déjà fait l'objet de publications indexées sont les suivants :

- 1) Etude de la physiologie du végétal et couplage à des méthodes de physicochimie analytique afin de comprendre les processus d'intégration et de cumul des polluants inorganiques d'origine atmosphérique dans les différents tissus d'une tige (**publication 1**).
- 2) Etude des caractéristiques du dépôt de surface (dynamique d'accumulation, observations microscopiques, détermination de la composition élémentaire...) afin d'établir une méthode permettant d'identifier la part de chaque élément issu des activités anthropiques (**publication 2**).
- 3) Etude méthodologique du couplage de trois techniques analytiques (ICP-MS, PIXE et SEM-EDX) visant à obtenir une meilleure compréhension des mécanismes d'intégration et de stockage des polluants inorganiques d'origine atmosphérique sur et dans les écorces des arbres (**publication 3**).
- 4) Etude du phénomène d'intégration tissulaire de polluants atmosphériques inorganiques à l'état solide (particulaire) et/ou dispersé (ionique) par l'observation in situ (SEM-EDX) et par la mise en place d'une méthode de traitement ménagé des cendres (**publication 4**).
- 5) Etude comparative des dépôts atmosphériques sur les écorces d'arbres et de la distribution des populations de lichens dans un ENS (Espace Naturel Sensible) dans un massif alpin surplombant la ville de Grenoble (**publication 5**).
- 6) Développement d'un outil de mise en évidence de polluants inorganiques à l'état de traces dans des échantillons d'origine végétale par une incinération suivie d'une extraction ménagée (**publication 6**).

Publication 1 : Catinon, M., Ayrault, S., Daudin, L., Sevin, L., Asta, J., Tissut, M., Ravanel, P., 2008. Atmospheric inorganic contaminants and their distribution inside stem tissues of *Fraxinus excelsior* L. *Atmospheric Environment* 42, 1223-1238.

Publication 2 : Catinon, M., Ayrault, S., Clocchiatti, R., Boudouma, O., Asta, J., Tissut, M., Ravanel, P., 2009. The anthropogenic atmospheric elements fraction: a new interpretation of elemental deposits on tree barks. *Atmospheric Environment* 43, 1124-1130.

Publication 3 : Ayrault, S., Catinon, M., Clocchiatti, R., Tissut, M., Asta, J., 2009. Complementarity of analytical tools in biomonitoring studies. *Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry* 281, 131-136.

- Publication 4 :** Catinon, M., Ayrault, S., Boudouma, O., Asta, J., Tissut, M., Ravanel, P., 2009. The inclusion of atmospheric particles into the bark suber of ash trees. *Chemosphere* 77, 1313-1320.
- Publication 5 :** Agnello, G., Catinon, M., Ayrault, S., Asta, J., Tissut, M., Ravanel, P., 2009. A comparative study of atmospheric deposits and lichen populations in a protected alpine area in the Grenoble region. *International Journal of Environment and Health*. (Submitted).
- Publication 6 :** Catinon, M., Ayrault, S., Boudouma, O., Tissut, M., Ravanel, P. The tree bark suber: a noteworthy site where to study atmospheric elements long-term accumulation. (in prep.).

Chapitre II

Matériel et méthodes

Sommaire

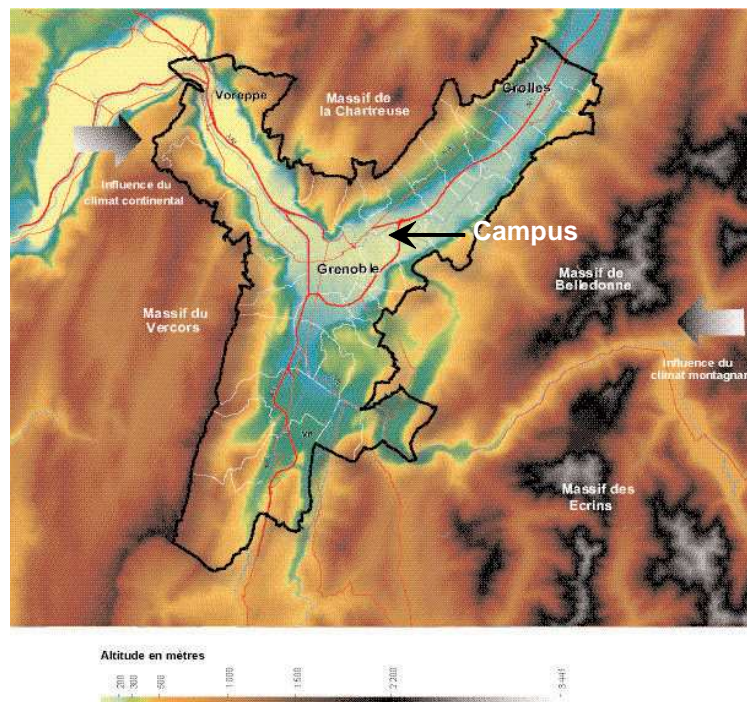
II.1. Définition de la station expérimentale.....	58
II.2. Principes d'analyses	61
II.3. Echantillonnage	66
II.4. Etude du matériel végétal utilisé	69
II.5. Etude de l'effet de la pluie sur le dépôt de surface.....	77

II.1. Définition de la station expérimentale

II.1.1. Site d'étude

L'essentiel de notre étude devait se concentrer sur un site donné, proche du laboratoire et, disposant en abondance de l'arbre choisi comme modèle et pouvant être équipé de dispositifs expérimentaux.

Le site retenu se trouve sur le campus grenoblois de Saint Martin d'Hères/Gières à proximité du Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA) à 4km du centre ville de GRENOBLE à une altitude de 200m. Il est situé à 800m de l'autoroute A41 Grenoble-Chambéry (50000 véhicules/jours) et d'une rivière (Isère) affectant à la fois l'apport et les courants des métaux lourds d'origine atmosphérique. Ce site est un site urbain situé dans une cuvette enclavée au sein de montagnes (massifs de Belledonne, de Chartreuse et du Vercors). Cette particularité géographique (3 massifs entourent la ville) (**Figure 2.1**) influe négativement sur la qualité de l'air qui est notamment due à la faiblesse des vents et au phénomène d'inversion thermique en hiver (qui conduit au "piégeage" des polluants en suspension dans l'air).



Source des données : - relief : Geosys Data (Modèle Numérique de Terrain Mona),
- fond de carte : IGN (BD Cartho).

Figure 2.1 : Illustration du relief autour de la ville de Grenoble

II.1.2. Définition d'une station et de ses référents

Nous avons choisi un site majeur d'étude sur lequel se sont déroulées la majorité de nos expérimentations. La validation des méthodes que nous avons envisagées nécessite, d'une part, d'établir des sites de référence (ou sites témoins) qui doivent être le moins possible soumis à des pressions polluantes et d'autre part des sites de comparaison où les sources et les signatures de pollution peuvent être connues.

Un site de référence que nous avons retenu est celui de Névache (Hautes Alpes). Il s'agit d'une station de montagne située à 1700 m d'altitude et à environ 13 km au nord de Briançon. Du fait de l'altitude élevée et de son isolement géographique par rapport aux diverses sources anthropiques, on a supposé que cette station pouvait être une "station témoin". Nous avons par ailleurs utilisé un site témoin artificiel de laboratoire avec la culture de frênes à partir de graines en salle conditionnée à l'abri des apports anthropiques extérieurs.

Le marais des Seiglières est un troisième site de comparaison intéressant du fait de sa situation par rapport à notre site d'étude. Il se situe dans un des 3 massifs qui entoure la ville de Grenoble : le massif de Belledonne. Ce site est un Espace Naturel Sensible (ENS) localisé à environ 25 km de Grenoble à une altitude de 1100 m (**Figure 2.2**), au niveau de la couche limite d'inversion thermique de la cuvette grenobloise. On veut ainsi savoir si l'accumulation des polluants dans la cuvette Grenobloise avait une influence sur ce site.

Nous avons aussi étudié des sites de comparaison que l'on suppose très pollués et qui doivent permettre d'établir des signatures de pollution, comme le tunnel autoroutier de l'Epine (Savoie) associé à une pollution due à la circulation automobile et le site de l'usine Téfal (Rumilly, 74) associé à une pollution industrielle particulière (téflon).

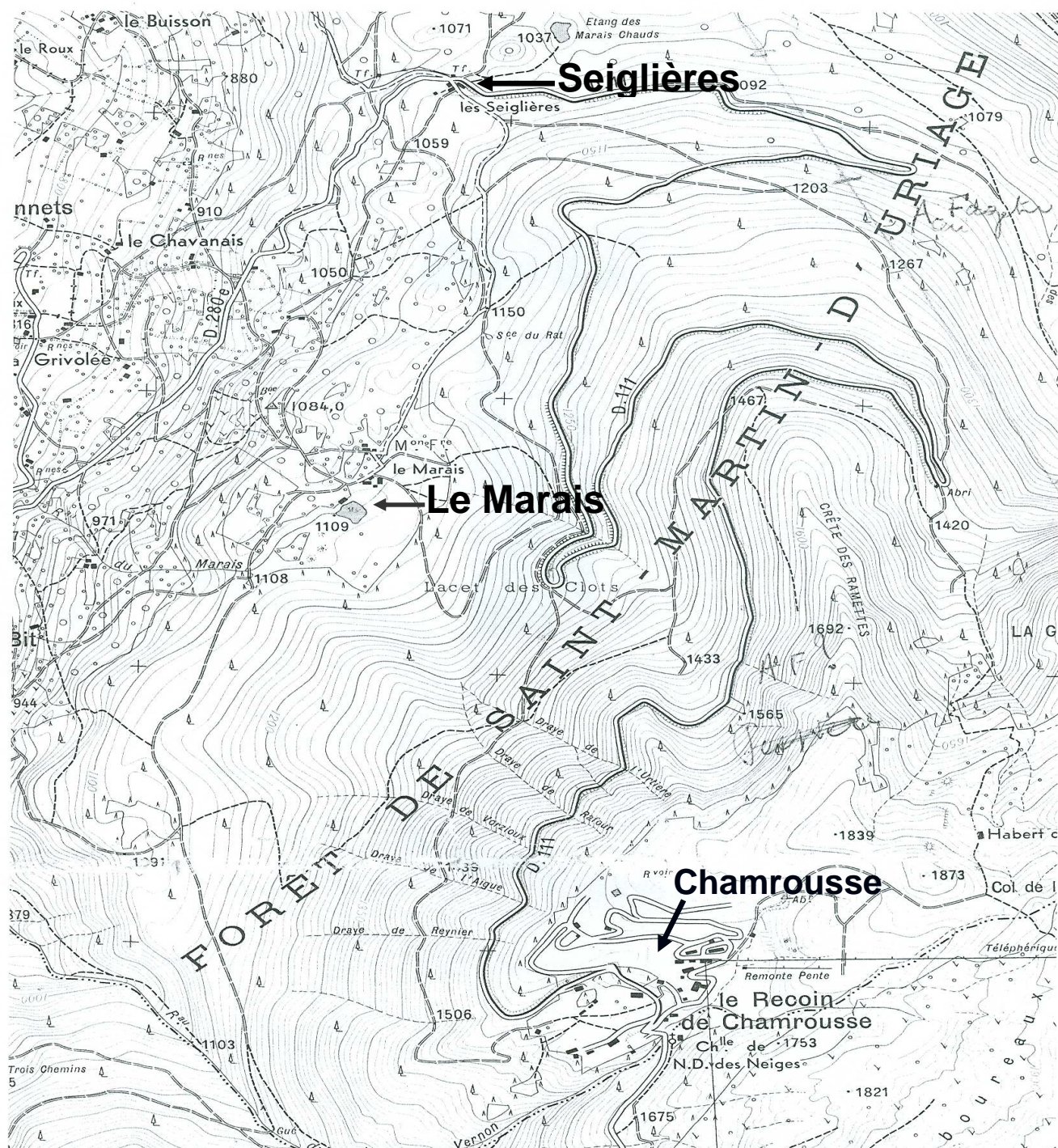


Figure 2.2 :

Figure 2.2 : Localisation du site d'étude d'altitude : le marais des Seiglières (1100 m, Massif de Belledonne).

II.2. Principes d'analyses

II.2.1. ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer)

L'échantillon à analyser subit d'abord un traitement chimique visant à dissoudre totalement les différents composants qui le constituent (Ayrault *et al.*, 2001). L'étape de digestion a été réalisée dans des flacons fermés de PTFE, sur une plaque de digestion (Digiprep, SCP Science). Les réactifs utilisés étaient de catégorie ultra pure. Le mélange acide (HNO_3 , HF, HClO_4) a été choisi pour dissoudre tous les matériaux, quelle que soit l'origine (organique ou minérale). 2 ml d'acide nitrique ont été ajoutés aux échantillons dans les flacons, qui ont alors été chauffés pendant 24 heures à 120° C. Après refroidissement, 2 ml d'acide fluorhydrique ont été ajoutés et les flacons ont été chauffés pendant 3 heures à 120° C. Après un nouveau refroidissement, 1 ml de HClO_4 a été ajouté et les flacons ont été chauffés pendant 3 heures. Trois additions successives de HNO_3 et de chauffage presque à sec dans des flacons ouverts ont été effectuées. Les solutions nitriques résultant de la digestion complète ont été ramenées au même volume avec de l'eau ultra-pure. Le contenu élémentaire a été analysé par spectrométrie de masse quadripolaire à source plasma ICP - MS (Xseries, électron thermo), selon le procédé décrit par Ayrault *et al.* (2001). La qualité des données a été contrôlée avec des matériaux de référence (lichen-336 et sediment-SL1, tous les deux de l'Agence internationale de l'énergie atomique, Vienne). Les valeurs obtenues avec ce procédé ont bien été en accord avec les valeurs certifiées et peuvent être trouvées dans Revel et Ayrault (2000) et Ayrault *et al.* (2001), Ayrault *et al.* (2007b). La solution ainsi obtenue est ensuite introduite à l'aide d'une pompe péristaltique dans une chambre de vaporisation où elle est transformée en un aérosol de très fines gouttelettes à l'aide d'argon gazeux. L'aérosol ainsi formé est envoyé dans un plasma d'argon à très haute température (entre 6 000 et 10 000 °C), suffisante pour ioniser complètement la plupart des éléments. Un système de vide différentiel accélère les ions du plasma vers un ensemble de lentilles électrostatiques qui extrait les ions chargés positivement et les transporte vers un filtre de masse quadripolaire. Ce filtre de masse transmet seulement les ions présentant un rapport masse sur charge particulier, déterminé en fonction de la fréquence appliquée au quadripôle. Un détecteur d'ions enregistre alors les ions transmis ; pour un isotope donné, le nombre d'ions mesuré permet de calculer directement la concentration de l'élément analysé grâce à un logiciel permettant le traitement quantitatif et qualitatif de l'enregistrement (**Figure 2.3**).

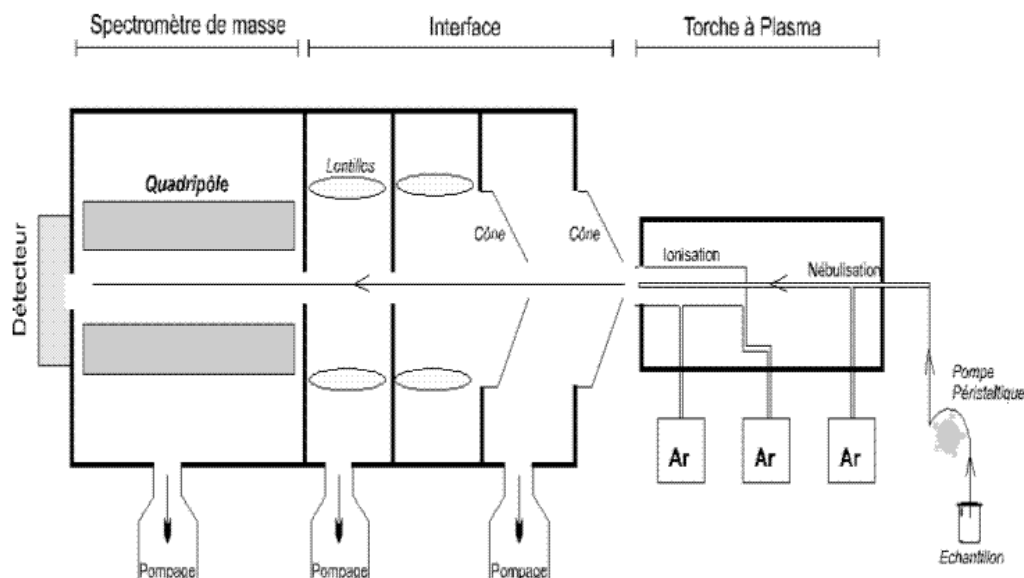


Figure 2.3 : Principe du fonctionnement de l'ICP-MS

Source : http://iramis.cea.fr/Phoce/Vie_des_labos/Ast/astimg.php?voir=4&type=unit

Après excitation, les atomes contenus dans l'échantillon émettent de la lumière dont la longueur d'onde leur est caractéristique. La lumière est transmise par l'intermédiaire du système optique (réseau + prisme) vers un détecteur CID (caméra vidéo), qui permet le dosage. Les limites de détection des éléments traces varient selon l'élément : elles sont de l'ordre du ppb ou de la dizaine de ppb.

II.2.2. PIXE (Proton Induced X-ray Emission) (Figure 2.4)

Méthode performante et non destructive, la méthode PIXE consiste à capter les rayons X émis par l'échantillon lorsqu'il est placé dans le faisceau d'un accélérateur de particules. L'analyse des rayons X provenant de l'échantillon, bombardé de protons de quelques MeV, permet alors de définir sa composition multi-élémentaire. L'émission de rayons X caractéristiques dépend des transitions électroniques orbitales des atomes du matériel analysé. Quand un électron est éjecté par une particule chargée (le proton), l'atome s'ionise et est laissé dans un état excité. Cette énergie peut être libérée par la transition d'un électron d'une couche supérieure vers une couche interne s'accompagnant de l'émission d'un photon X (propre à chaque élément). Tous les détails techniques sont disponibles dans Ayrault *et al.*, (2007a).

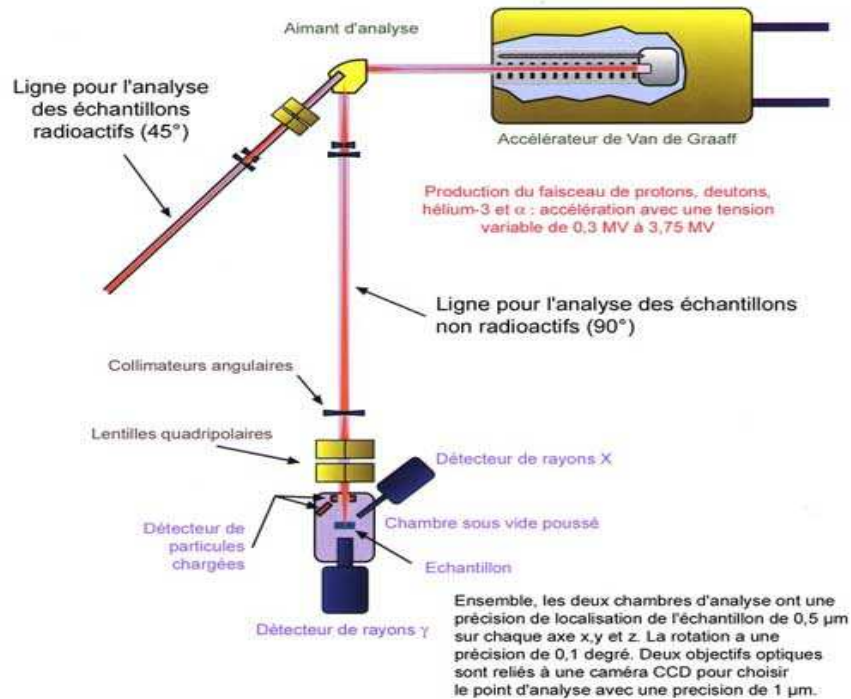


Figure 2.4 : Principe du fonctionnement de la méthode PIXE

Pour l'acquisition et le traitement du signal, on utilise généralement un détecteur à semi-conducteur. Pour chaque photon X détecté, la chaîne d'acquisition génère une impulsion électrique d'amplitude proportionnelle à l'énergie du photon. Le signal analogique est alors amplifié puis converti en valeur numérique, ce qui permet d'obtenir un spectre, tel que celui représenté dans la **Figure 2.5**. Les cartes élémentaires et les spectres ont été générés avec le logiciel RISMIN (Daudin *et al.*, 2003).

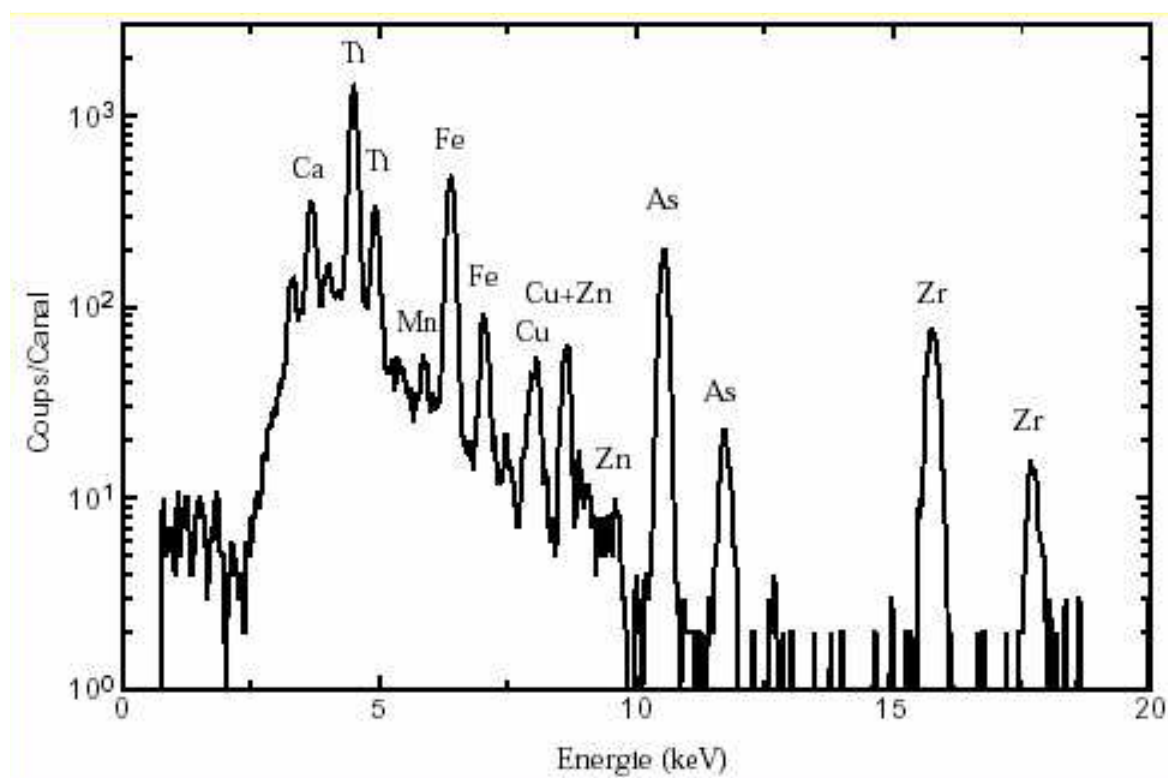


Figure 2.5 : Exemple de spectre PIXE pour une cible multi-élémentaire

Source : www.ipnl.in2p3.fr/ace/techniques/pixe.html

En PIXE, la plus grande efficacité est obtenue pour les éléments de numéro atomique compris entre 20 et 40, et supérieur à 75. Néanmoins tous les éléments de numéro atomique supérieur à 11 (sodium) peuvent être détectés. Cette technique non destructive permet d'analyser rapidement un échantillon avec une sensibilité pouvant aller jusqu'à quelques dizaines de ppm (sensibilité optimale pour des numéros atomiques allant de 20 à 30). Elle permet de déterminer la composition d'une cible multi-élémentaire inconnue avec une précision de $\pm 5\%$.

II.2.3. SEM-EDX (Scanning Electron Microscope – Energy Dispersive X ray) (Figure 2.6)

Le SEM analyse la surface d'objets solides, et produit des images de très haute résolution bien supérieure à celle des microscopes optiques. L'analyse de petites particules par microscopie électronique à balayage (MEB en français) couplée à de l'analyse dispersive de rayons X (EDX) est possible sans détruire l'échantillon. Le couplage MEB/EDX fournit une information qualitative sur les éléments présents dans une particule ou bien sur leur localisation dans un échantillon massif.

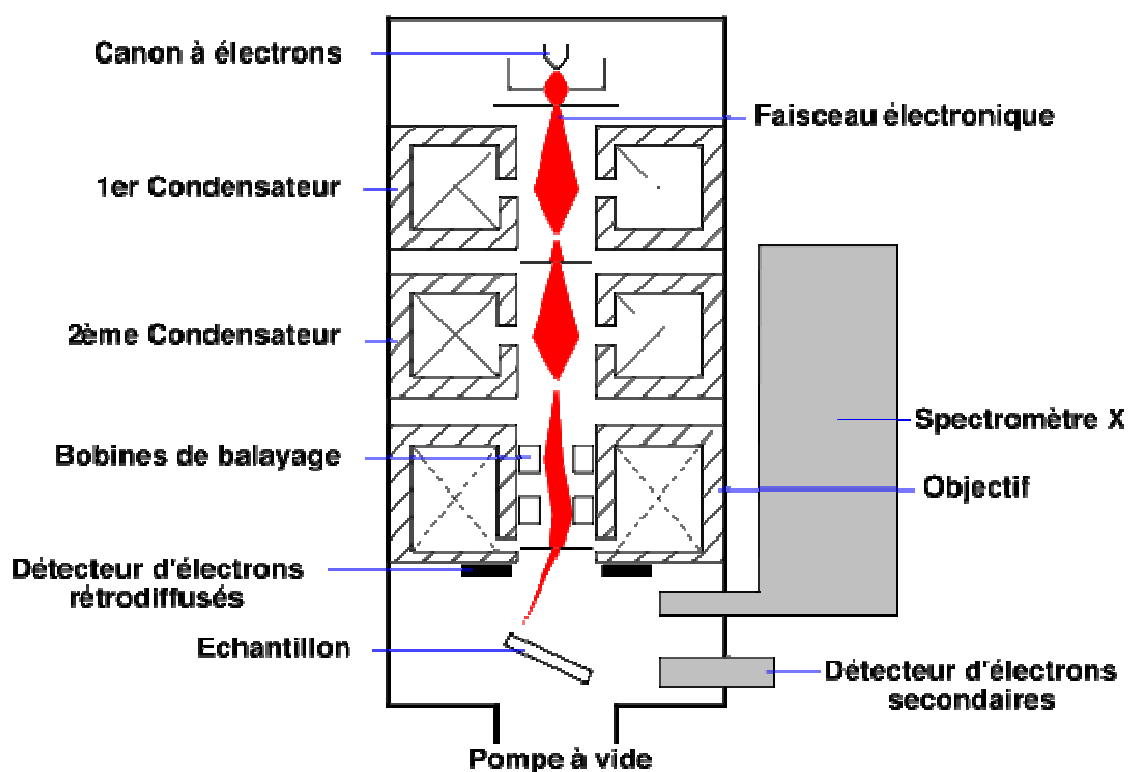


Figure 2.6 : Principe du fonctionnement du SEM-EDX

Source : http://fr.wikipedia.org/wiki/Microscopie_%C3%A9lectronique_%C3%A0_balayage

Par cette technique, il est possible d'observer des objets de très petite taille et d'analyser chimiquement des zones très réduites (quelques microns). Ainsi est-il possible d'effectuer de véritables cartes de répartitions chimiques. La sensibilité de la micro-analyse chimique par SEM-EDX est de quelques ppm pour les métaux et permet de détecter des éléments légers (à partir du bore).

La détermination des particules ainsi que l'analyse chimique des particules a été réalisée en utilisant la microscopie électronique à balayage (ZEISS SUPRA 55 VP) avec une colonne GEMINI de 3^{ème} génération couplant de la microscopie électronique à balayage (MEB) à l'analyse d'émission de rayons X par dispersion d'énergie (EDX). Les paramètres que sont le déplacement de l'échantillon, la sélection de la zone à analyser et l'imagerie ont été contrôlés par ordinateur. Les particules métalliques sont automatiquement détectées par le mode d'imagerie en électrons secondaires (SE2) alors que le mode des électrons rétrodiffusés nous donne des informations sur le relief de l'objet analysé. La distance de travail du microscope est de 6 mm, la tension d'accélération de 15 kV. Les échantillons ont été recouverts de carbone. Des zones des échantillons analysés ont été observées et photographiées par MEB, et

la distribution des éléments a été examinée soit en cartographie, soit en un point en utilisant l'analyse EDX.

II.3. Echantillonnage

II.3.1. Lavage du dépôt sur les écorces

Les dépôts sur les écorces ont été recueillis sur des surfaces définies (2 à 10 dm²) par un rinçage répété de la surface de l'écorce à raison de 10 ml d'eau distillée par dm² avec l'aide d'un pinceau (voir la **Figure 2.7**). La suspension obtenue a été centrifugée à 8000 rpm. Le culot a été séché et le surnageant évaporé. Le poids de la matière sèche a été mesuré. Suite à cette procédure, le surnageant contient les éléments issus des fractions solubles et colloïdales du dépôt superficiel, alors que le culot est composé de particules insolubles. Tous les échantillons ont été séchés et conservés à l'obscurité dans des flacons en Téflon fermés et à température ambiante.

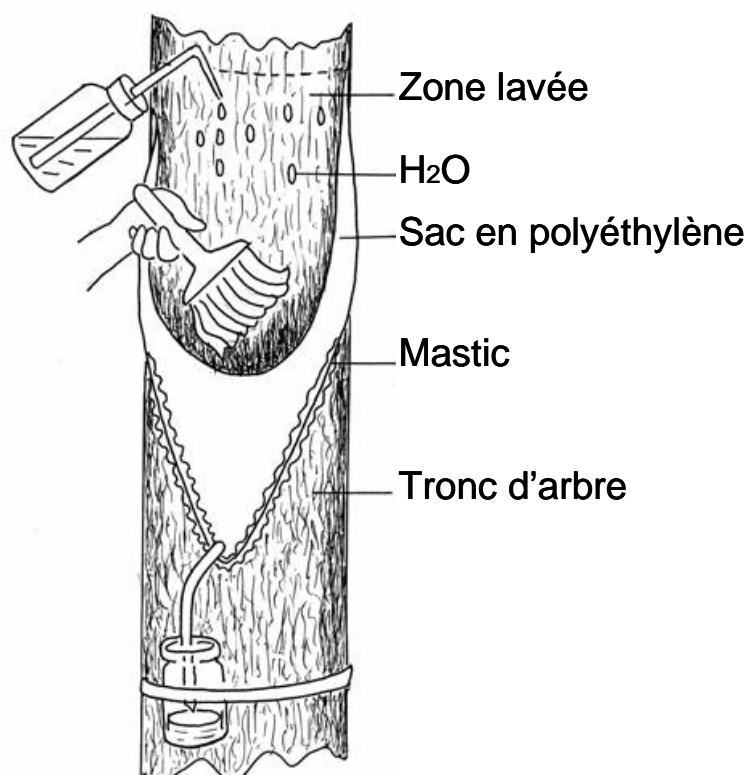


Figure 2.7 : Schéma illustrant l'échantillonnage du dépôt de surface sur le tronc en place

II.3.2. Prélèvements de rameaux et de feuilles

Les troncs et branches ont été coupés en plusieurs fragments avant stockage au laboratoire (pour des raisons de commodité) et les feuilles séchées ont été rassemblées et stockées dans un sac plastique (qualité alimentaire) en chambre froide (à +4°C). Pour le frêne, les rameaux ont été échantillonnés selon leur âge.

II.3.3. Prélèvements des écorces

A l'aide d'une scie, d'un ciseau à bois et d'un marteau, on décolle l'écorce du cambium (opération réalisable surtout au printemps ou en été lorsque la zone cambiale est en activité). Les plaques d'écorces de forme rectangulaire et de surface moyenne de 6 dm² sont prélevées à une hauteur de 1,50 m. Des écorces de bouleau, de hêtre, de peuplier noir, de peuplier blanc et de frêne ont été récoltées ainsi.

II.3.4. Perte au feu

Il s'agit d'une minéralisation d'échantillons solides par élimination de la matière organique (essentiellement par dégagement gazeux du CO₂) suite à un chauffage intense. Les échantillons sont placés dans un four à moufle à 550°C pendant une durée de 24H montée graduelle de la température. La masse sèche des échantillons et la masse des cendres étant mesurée, on peut déterminer le pourcentage de minéraux présents dans un échantillon donné. Les échantillons incinérés peuvent ensuite faire l'objet d'analyses physico-chimiques à condition d'avoir respecté la montée graduelle de la température (Harju *et al.*, 2002 ; Saarela *et al.*, 2005). Cette technique de minéralisation par incinération offre de nombreux avantages pour des matrices organiques. Elle a cependant été critiquée en raison de la perte éventuelle d'éléments, en particulier les éléments volatils comme As. Finalement, après la validation de cette technique par Harju *et al.* (1997), la minéralisation par incinération est désormais admise par la communauté scientifique.

II.3.5. Fractionnement des cendres

Des échantillons ont été incinérés à 550°C afin d'éliminer la matière organique et ne garder que la matière minérale. Les cendres ont subi un traitement afin d'observer la répartition des éléments dans les différentes fractions obtenues. Cent milligrammes de cendres sont additionnés à 10 ml d'eau distillée et mis en suspension par agitateur magnétique pendant 10 minutes. Le mélange est ensuite centrifugé à 5000 rpm pendant 5 minutes, la solution (que l'on appellera "fraction H₂O") a été séparée du culot. On mesure son pH. Cette fraction est ensuite deshydratée à l'étuve à 80°C.

Le culot resuspendu dans 10 ml d'eau distillée est agité et progressivement acidifié par ajout d'acide nitrique 2N 100 µL par 100 µL jusqu'à un pH de 2,5. La suspension est alors centrifugée 5 minutes à 5000 trs.min⁻¹. La solution (que l'on appellera "fraction HNO₃") est prélevée, séchée à l'étuve à 80°C puis pesée. Le culot est lavé par 10 ml d'eau distillée, pour éliminer les traces d'acide, puis centrifugé 5 minutes à 5000 rpm. Le culot (que l'on appellera fraction résiduelle solide) est alors séché à l'étuve à 80°C puis pesé.

II.3.6. Quantification de la taille des particules

Une aliquote est montée entre lame et lamelle, observée puis photographiée en microscopie optique. Les clichés sont ensuite analysés pour déterminer la taille des particules qui ont été triées selon leur taille en différentes classes : inférieures à 1 µm, 2 µm, 3 µm, 3 à 5 µm, 5 à 10 µm, 10 à 20 µm et 20 à 50 µm (cf chapitre VII).

II.3.7. Recherche de lieux d'accumulation

En plus de l'étude de l'accumulation de polluants d'origine atmosphérique par les écorces d'arbres, nous avons cherché, sur notre site d'étude, des lieux ayant aussi une capacité de cumul des dépôts d'origine atmosphérique. Cela nous a conduit à étudier différentes localisations et différents processus d'accumulation :

- Surfaces vitrées d'infrastructures

L'échantillonnage a été réalisé sur des plaques de verre en place depuis 40 ans et constituant le toit d'une serre de notre station expérimentale (campus). Les dépôts ont été raclés à l'aide d'un scalpel (et/ou d'une lame de rasoir). Ils ont ensuite été séchés (24H à 100°C) et stockés.

Cette matrice est particulièrement intéressante car elle provient d'un matériau lisse et inerte permettant de récolter une masse importante de dépôt. L'âge moyen du dépôt est estimé à plus de 30 ans.

II.3.8. Prélèvement des dépôts sur paroi d'un tunnel autoroutier

Le dépôt de poussières sur les parois d'un tunnel autoroutier long de 3200 m et existant depuis 30 ans (A43, tunnel de Lépine, Savoie, France, 30 000 véhicules par jour) a été échantillonné. Les poussières ont été récoltées par brossage de la paroi, séchées, stockées dans des sachets en plastique puis conservées à l'obscurité et à température ambiante.

II.4. Etude du matériel végétal utilisé

II.4.1. Culture de plantes en salle conditionnée

Des graines de frêne (*Fraxinus excelsior* L.) ont été récoltées sur un site que l'on considère peu pollué (lac d'Aiguebelette). Elles ont ensuite été placées en chambre froide à une température de 4°C et à l'obscurité pendant une durée de 4 mois afin de simuler la période hivernale susceptible de lever la dormance. Un raclage des graines a ensuite été opéré pour limiter l'inhibition de la germination par les composés des téguments. Les graines sont alors placées dans une boîte de Pétri dans une salle de culture en conditions contrôlées (25°C, 80% d'humidité, photopériode 16 heures de jour, 8 heures de nuit, 4000 Lux). Après germination, les plantules ont été placées dans du terreau. La suite de la culture a eu lieu dans la même salle de culture, donnant des arbustes de 2 ans et plus, qui se sont développés rapidement.

II.4.2. Observation de l'anatomie d'une tige de frêne

Une partie de notre travail devait porter sur la distribution interne des éléments dans les tissus des tiges. Il se fondait ainsi sur une connaissance anatomique précise. Des coupes transversales fines de tige de frêne ont été réalisées, vidées de leur contenu cellulaire et colorées pour pouvoir visualiser les cellules et leurs constituants, le plus souvent grâce à la double coloration Carmin-vert d'iode (colorant de Mirande). Ce colorant colore en rose les structures cellulosesiques (comme les parenchymes, le phloème primaire et secondaire et les

collenchymes) et en vert les structures contenant de la lignine (sclérenchymes, le xylème primaire et secondaire) et en jaunâtre le suber (appelé aussi liège).

Le détail des fractions tissulaires d'une tige de frêne est présenté (**Figures 2.8 et 2.9**).

De l'extérieur vers l'intérieur de la tige on observe :

- 1) **L'épiderme**, constitué de cellules vivantes non chlorophylliennes, allongées parallèlement à l'axe de la tige et recouvertes d'une couche imperméable à l'eau de cutine et parfois de cires limitant ainsi la transpiration. Il n'est vivant que dans les tiges jeunes d'âge inférieur à un an.
- 2) **Le suber** (ou liège) est un tissu de revêtement secondaire issu d'une assise génératrice : le phellogène. Il est constitué de cellules qui meurent rapidement à paroi secondaire épaissie et subérisée (paroi imprégnée de subérine rendant l'écorce imperméable à l'eau et partiellement aux gaz), alignées radialement.
- 3) **Le phellogène (ou assise subéro-phellodermique)** : ce méristème secondaire produit des cellules qui se différencient vers l'intérieur en phelloderme (parenchyme secondaire), et vers l'extérieur en suber (liège). Il peut apparaître à une profondeur variable de la tige. La formation de liège entraîne la mort des tissus situés à l'extérieur de ces assises imperméables.
- 4) **Le phelloderme** : est constitué d'une ou deux couches de parenchyme.
- 5) **Le parenchyme cortical** issu de la structure primaire de la tige est constitué de cellules à paroi mince, habituellement cellulosique, allongées parallèlement au grand axe de la tige. Ses assises externes sont chlorophylliennes ; ses assises profondes accumulent des matières de réserve.
- 6) **Le collenchyme** : Tissu de soutien d'origine primaire constitué de cellules vivantes à paroi primaire épaissie ce qui les rend bien reconnaissable.
- 7) Il existe un autre tissu de soutien, **le sclérenchyme (ou fibres périlibériennes)** constituée des cellules à parois extrêmement épaisses et lignifiées, ce qui fait qu'elles apparaissent colorée en bleu-vert.
- 8) **Le phloème** est le tissu conducteur de la sève élaborée et possède différents types de cellules : des tubes criblés, cellules vivantes allongées et sans noyaux, qui ont des parois longitudinales et transversales possédant des pores appelés cribles, des cellules compagnes accolées aux tubes criblés, des cellules parenchymateuses jouant un rôle de réserve et de sécrétion.
- 9) **Le cambium** (ou l'assise libéro-ligneuse ou encore **le cambium vasculaire**) met en place les faisceaux conducteurs secondaires. C'est la plupart du temps une couche cylindrique

mince entre le liber (ou phloème secondaire) et le bois (ou xylème secondaire). Il se développe vers l'intérieur et l'extérieur. Les nouvelles cellules générées sur l'intérieur sont des cellules (grandes, lignifiées) de xylème secondaire ou bois secondaire ; les nouvelles cellules à l'extérieur sont les cellules de phloème secondaire ou liber secondaire (petites, vivantes et celluloses). Le terme secondaire différencie ces nouveaux tissus du xylème et phloème primaires). L'activité de cette assise cesse en hiver sous nos climats et reprend au printemps. Cette interruption annuelle s'observe sur les troncs coupés par ce qui est communément appelé "cernes".

10) **Le xylème ou bois** : les cellules longitudinales se sont spécialisées en éléments de vaisseaux, en **fibres** et en cellules de parenchyme ligneux. Les **vaisseaux** remplissent la fonction conductrice de la sève brute (ascendante). La paroi des vaisseaux est parsemée de ponctuations, qui servent à l'échange de la sève brute. Les fibres constituent le tissu de soutien. Elles sont de très petit diamètre, possèdent une paroi cellulaire très épaisse et n'ont quasiment plus de lumen (espace vide à l'intérieur de la cellule).

La répartition et le stockage des substances nutritives sont assumés par le tissu appelé parenchyme ligneux. Ce sont les éléments vivants du bois ; leurs cellules contiennent un noyau. Le parenchyme axial est situé parallèlement aux fibres. Le parenchyme radial constitue les **rayons ligneux** (dits aussi médullaires).

11) **La moelle** correspond à la partie centrale du tronc, ou stèle de la tige et de la racine, occupée généralement par du parenchyme. Elle reste généralement cellulosique mais elle peut également se sclérifier. Chez le frêne, la moelle prend une place importante chez les jeunes tiges puis se résorbe ensuite, compressée par le bois.

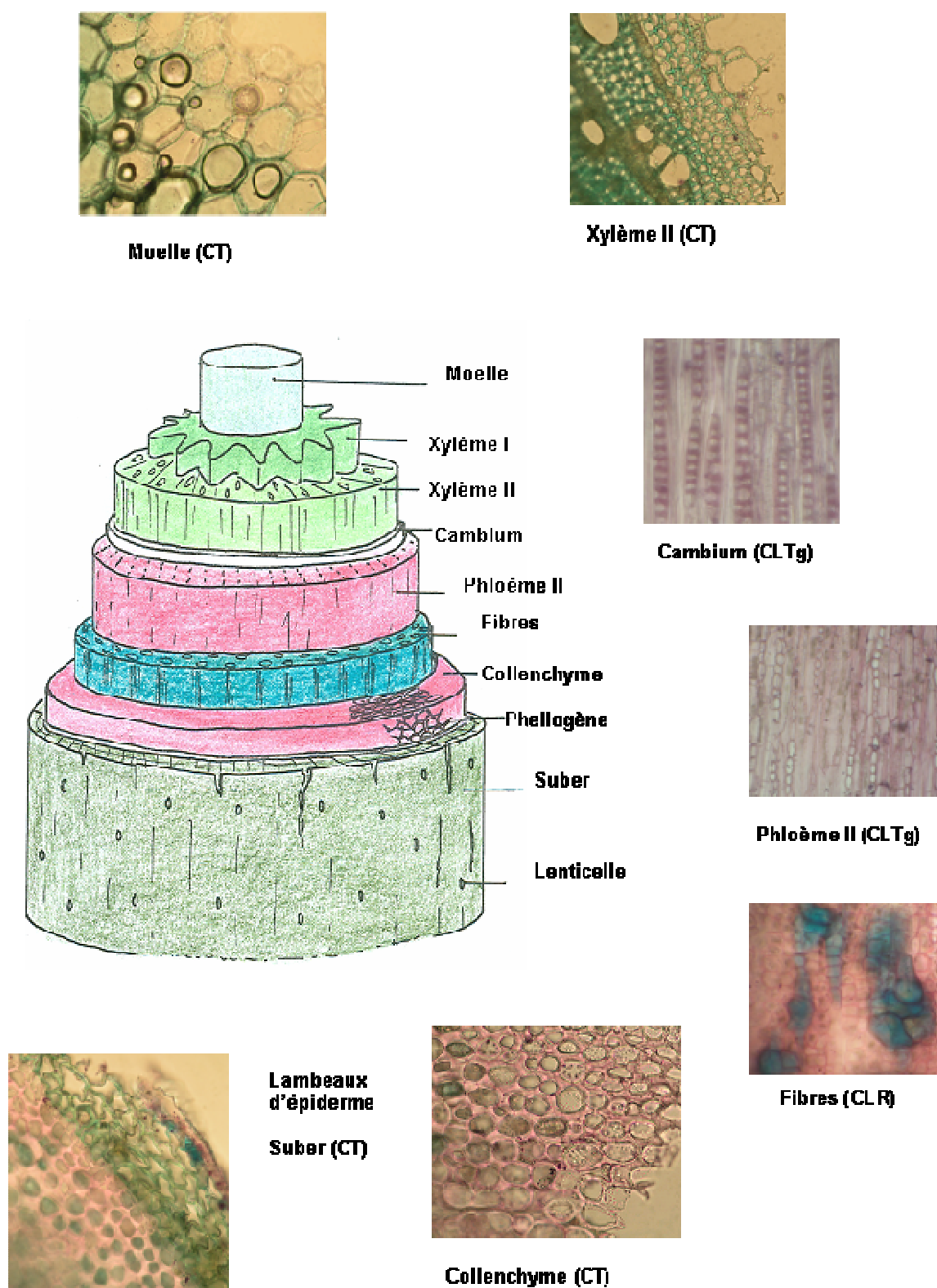


Figure 2.8 : Histologie dans une tige de frêne âgée de 1 an

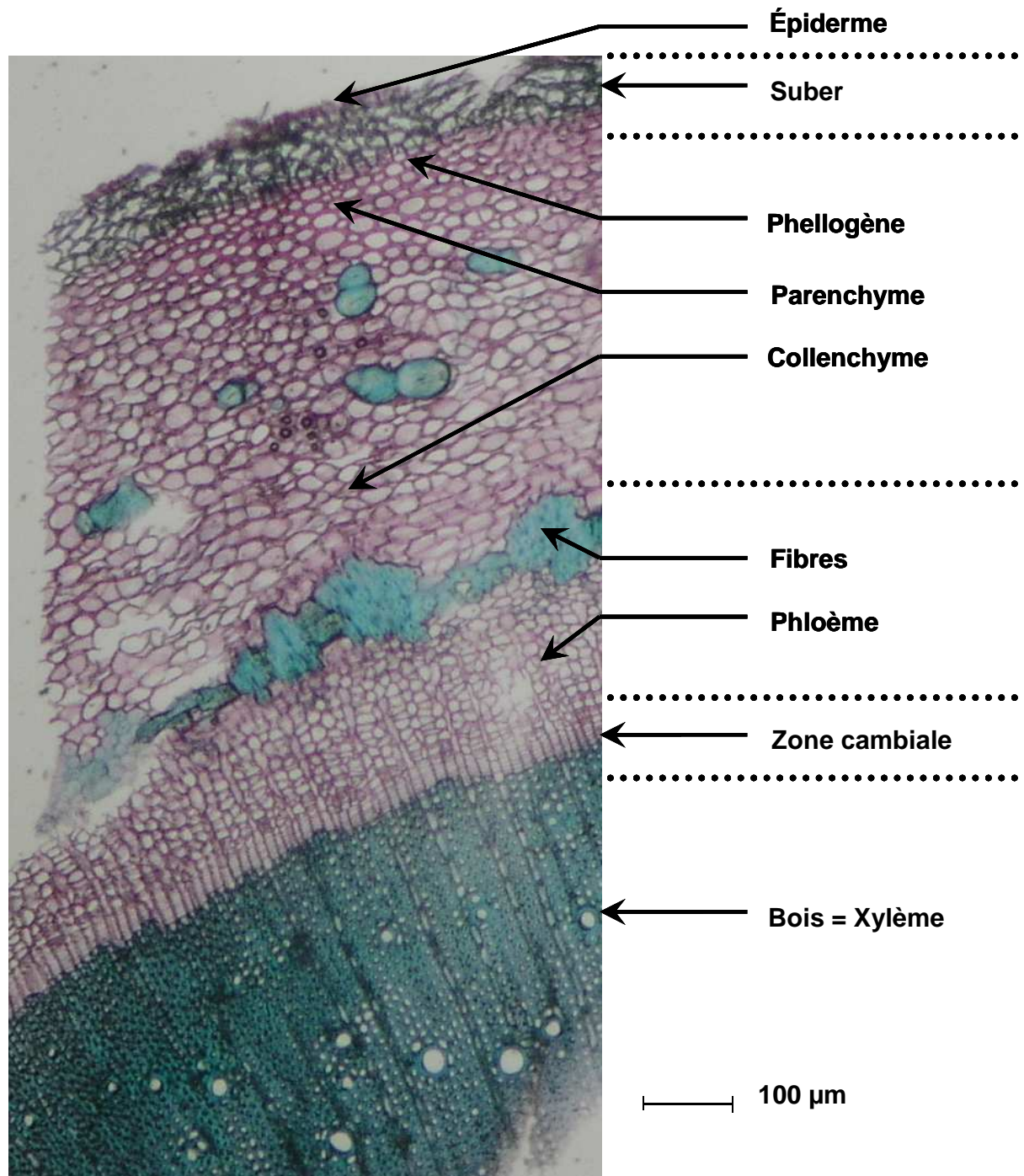


Figure 2.9 : Structure anatomique d'une tige de frêne de 1 an (coupe transversale)

La **Figure 2.10** schématise des coupes dans une tige de frêne, montrant la succession des différents tissus au cours de la croissance.

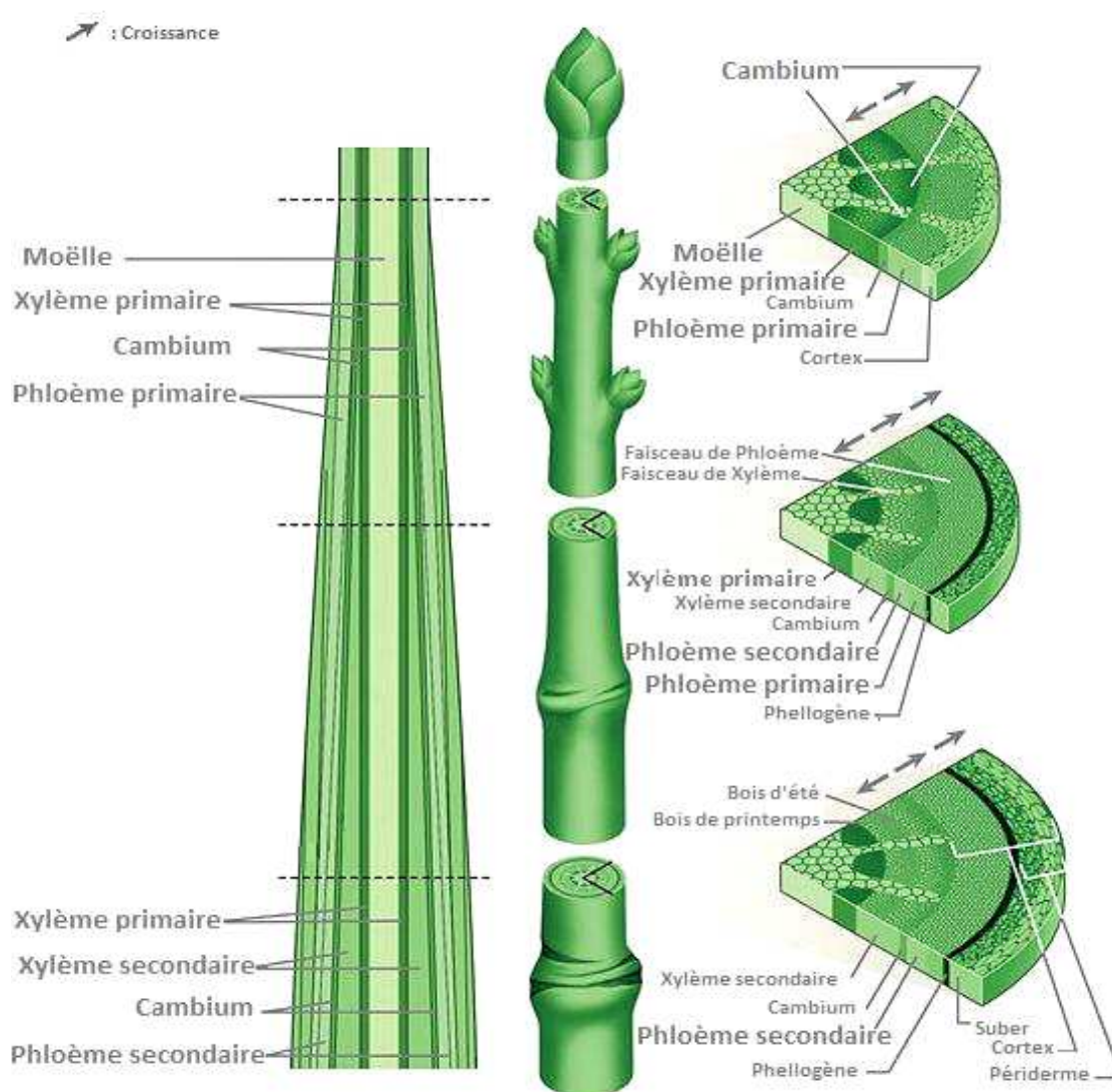


Figure 2.10 : Schéma illustrant la succession des tissus d'une tige au cours de sa croissance.
 Source : http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Stem-cross-section_%28fr%29.jpg

II.4.3. Fractionnement des tissus d'une tige

Après un lavage superficiel (ayant pour but d'éliminer le dépôt libre présent sur l'écorce), les fragments de tige sont pesés et leur dimensions mesurées. Le fractionnement tissulaire a été réalisé sur ce matériel frais suivant les indications de la **Figure 2.11** (ce ne serait plus possible après dessiccation du matériel).

Le principe général pour ce fractionnement mécanique est que, chez les arbres dicotylédones (et également chez les gymnospermes), il y a deux couches continues de division cellulaire active qui permettent la croissance du diamètre de la tige. Ces couches sont : 1) la couche de

cambium donnant des cellules de xylème vers l'intérieur de la tige et des cellules de phloème vers l'extérieur, 2) l'assise subérophellodermique formant majoritairement des cellules de suber sur la face externe. Pendant la saison de croissance, ces deux couches sont extrêmement fragiles (sans résistance mécanique) ce qui permet la séparation entre la couche de suber et le parenchyme et entre le bois et le phloème dans les tiges fraîches. (**Figure 2.11**). La méthode de fractionnement sera détaillée dans le chapitre V).

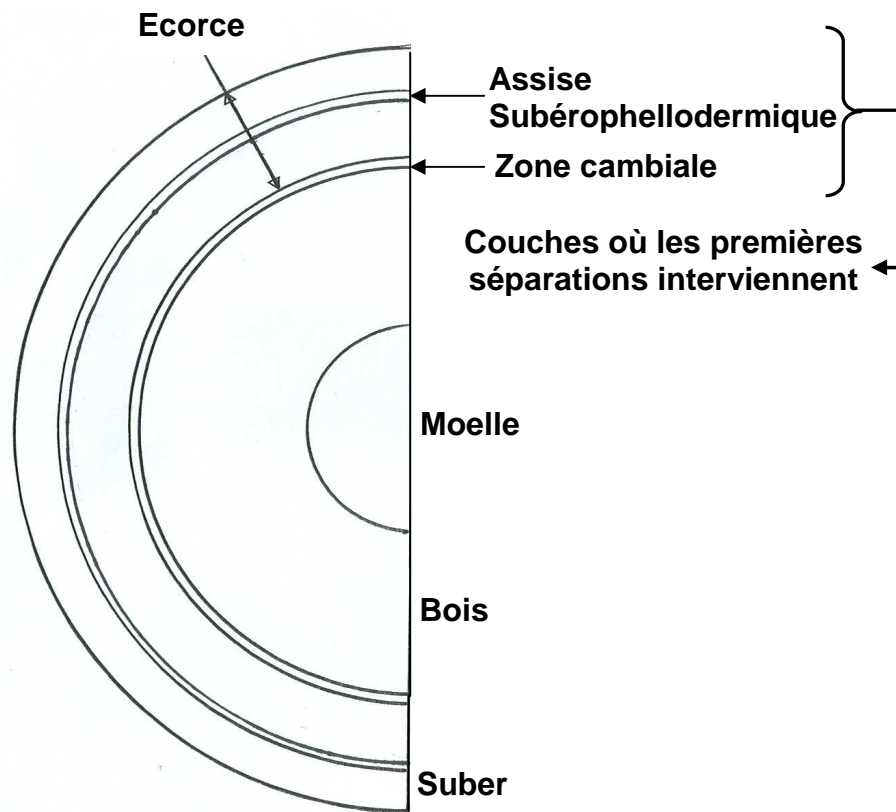


Figure 2.11 : Schéma illustrant le principe de séparation des tissus sur une tige fraîche de dicotylédone.

II.4.4. Récupération d'une fraction de sève brute dans des vaisseaux du bois

Des rameaux de frêne de 4 ans sont prélevés et coupés aux deux extrémités. Pour faire passer l'eau dans les vaisseaux du bois, un tuyau relié à une arrivée d'air comprimé (3,7 bar) a été utilisé. Cent millilitres d'eau distillée ont été introduits dans le tuyau et le rameau a été fixé au tuyau à l'aide d'un collier de serrage. Trente rameaux ont été utilisés et l'eau de lessivage des vaisseaux a été récoltée puis séchée à l'étuve. La masse sèche récoltée fait l'objet d'une analyse ICP-MS. L'eau circule dans les vaisseaux du bois des 2 derniers cerne (voire la coloration **Figure 2.12**).

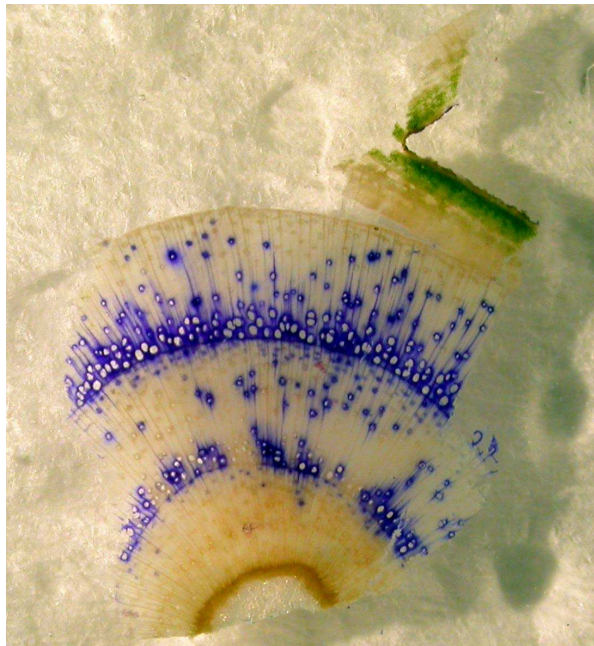


Figure 2.12 : Illustration des vaisseaux conducteurs fonctionnels du bois après le passage d'un colorant hydrosoluble.

II.4.5. Potomètre

Le dispositif décrit **Figure 2.13** est réalisé. On monte des tiges de 4 ans feuillues et défeuillées dont les cicatrices pétiolaires ont été oblitérées. Les pertes d'eau transpiratoires sont compensées par une absorption compensatoire de l'eau par la base de la tige qui est mesurée par déplacement du ménisque dans le tube gradué.

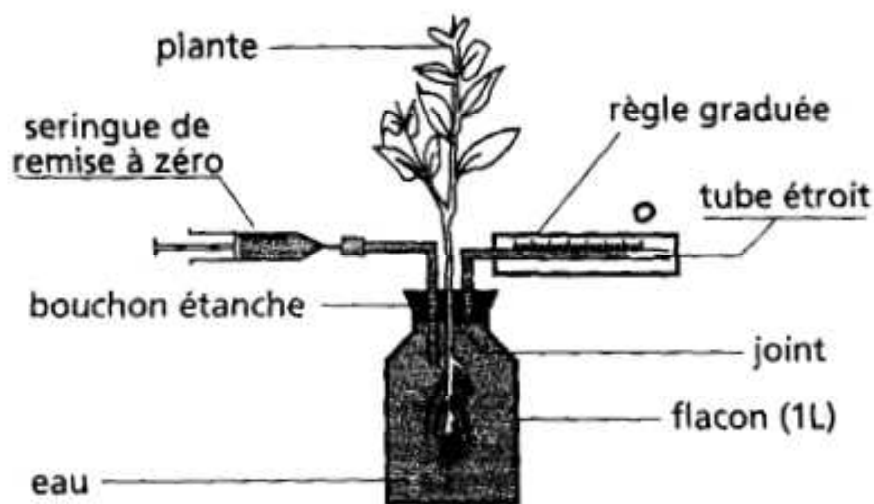


Figure 2.13 : Schéma illustrant le principe du potomètre

Source : www.crdp.ac-grenoble.fr/imel/rallye/05/s2_svt.htm

II.5. Etude de l'effet de la pluie sur le dépôt de surface

II.5.1. Récolte d'eau de pluie ruissellant sur le tronc (Figure 2.14)

Un sachet alimentaire est placé autour d'un tronc d'arbre à 1,50 m du sol, scellé à sa base avec du mastic, percé pour l'introduction d'un tuyau lui-même étanchéifié avec du mastic et lié pour qu'il ne colle pas au tronc. Le tuyau passe dans un seau maintenu accroché au tronc et recouvert d'un sac alimentaire (pour le protéger de la pluie et des poussières). L'eau de pluie qui ruisselle sur le tronc est alors récoltée dans le sachet et s'écoule ensuite dans le seau. Cette installation a été réalisée sur deux frênes âgés de 8 ans et la capacité maximale de récolte d'eau est de 10 litres (deux seaux de 5 litres). Pour le témoin "pluie", un seau est suspendu à 2,50 m du sol à 5 m de l'arbre où l'eau de pluie est directement collectée. Les récoltes d'eau ont été réalisées sur une période de 18 mois (du 31 janvier 2006 au 15 juin 2007) avec 55 récoltes.

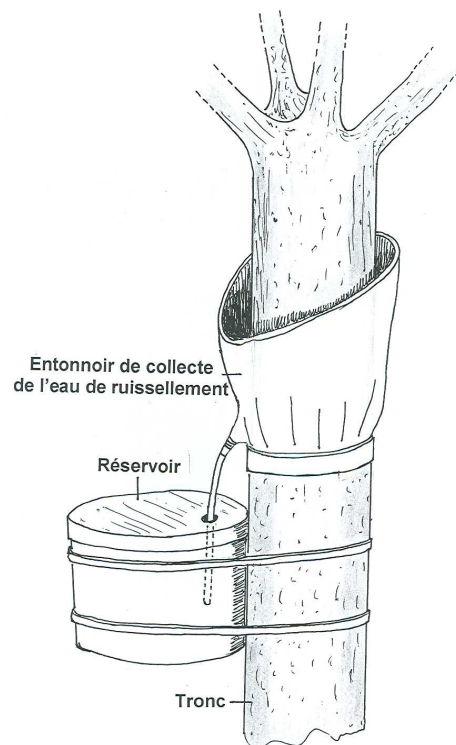


Figure 2.14 : Schéma du montage réalisé pour la récolte d'eau de pluie sur jeunes frênes

II.5.2. Traitement des eaux de pluie récoltées

L'eau de ruissellement le long des troncs est récoltée et concentrée à l'évaporateur rotatif après centrifugation des particules. Des analyses spectrométrique et chromatographique sont réalisées pour caractériser partiellement la composition du lessivat (notamment en polyphénols). Pour déterminer le rapport entre la masse minérale et organique contenue dans les lessivats, une incinération à 550°C (four à moufle) est réalisée à partir de la masse sèche. Une partie des concentrats a été soumise à une analyse élémentaire par ICP-MS (période du 27 février 2007 au 15 juin 2007).

Chapitre III

Stratégie de recherche

Sommaire

III.1. Introduction	80
III.2. Choix de la matrice	83
III.3. Choix de l'espèce	84
III.4. Choix de l'âge des rameaux	84
III.5. Séparation SUR et DANS l'écorce	85
III.6. Le dépôt libre est un écosystème. Comment analyser la partie d'origine anthropique ?	86
III.7. Le suber est le tissu le plus contaminé. Comment y différencier les éléments d'origine exogène des éléments issus de l'absorption racinaire ?	88
III.8. Eléments sous forme ionique ou sous forme particulière ? Etude par l'imagerie SEM- EDX et PIXE	89

III.1. Introduction

L'acquisition d'une connaissance solide de la distribution et de l'accumulation des polluants atmosphériques sur des pas de temps longs et à grandes distances est une des conditions pour comprendre les processus de distribution environnementale de xénobiotiques susceptibles d'altérer la santé humaine et la fonctionnalité des écosystèmes. La recherche de matrices accumulatrices est ainsi devenue une préoccupation marquée du dernier siècle écoulé, qui a débouché sur des pratiques devenues courantes. Ces pratiques mettant en œuvre l'analyse de matrices existantes ont été la source d'informations qualitatives et quantitatives précieuses, certes empiriques, mais suffisant à démontrer qu'on disposait là de structures dont les capacités d'enregistrement des phénomènes atmosphériques jusque là pratiquement incompris, pouvaient devenir le support d'un très grand progrès.

L'ambition de cette thèse, à ce moment charnière de la nécessaire prise de contrôle des émissions atmosphériques, a été, pour une matrice donnée - l'écorce des arbres - de construire une compréhension avancée, détaillée, des mécanismes qui déterminaient sa fonction accumulatrice jusque là empiriquement admise, des polluants atmosphériques. Pour réaliser un tel projet, il fallait expérimenter et faire confluer des connaissances qui relevaient de champs disciplinaires bien distincts : la chimie minérale, la physico-chimie atmosphérique, la physiologie des arbres, la biologie cellulaire, la pédologie et même la minéralogie et la géologie.

Le résultat premier de ce mémoire, abordé dans ce chapitre spécifique est donc de présenter et d'argumenter le programme stratégique choisi, forcément complexe, permettant de qualifier scientifiquement la matrice choisie (l'écorce d'arbre). Ce programme doit répondre à plusieurs questions :

- a) choisir une espèce d'arbre et la cultiver dans des conditions standardisées. Comment et pourquoi choisir une espèce ? Est-elle représentative des autres espèces ?
- b) l'écorce des arbres est-elle bien une matrice cumulative ? Quels sont les processus qui qualifient le phénomène d' "accumulation" ? Ce phénomène est-il identique pour tous les éléments apportés par l'atmosphère ? Ce phénomène est-il mono ou multiphasique ? Est-il réversible ?
- c) comment séparer, dans une matrice biologique, les éléments issus de la pollution atmosphérique de ceux qui sont les nécessaires constituants de la matière vivante ? Dans le cas des arbres, cela correspond aux ions du sol absorbés par le système racinaire.

d) y a-t-il une relation qualitative et quantitative entre les polluants présents constamment ou sporadiquement dans l'atmosphère et ce qui peut être accumulé dans une écorce d'arbre ?

Cette dernière question nécessitait une approche temporelle. Pour espérer accéder à des cumuls sur des pas de temps très longs (10 ans, 100 ans...) il fallait valider notre démarche sur des pas de temps plus courts (1 mois, 1 an, 4 ans...) de manière à comparer ce qui s'était déposé à ce qui s'était trouvé dans l'atmosphère pendant le même temps.

L'articulation de ces différentes questions nous a ainsi amené à construire un plan de stratégie expérimentale que résume la **Figure 3.1**.

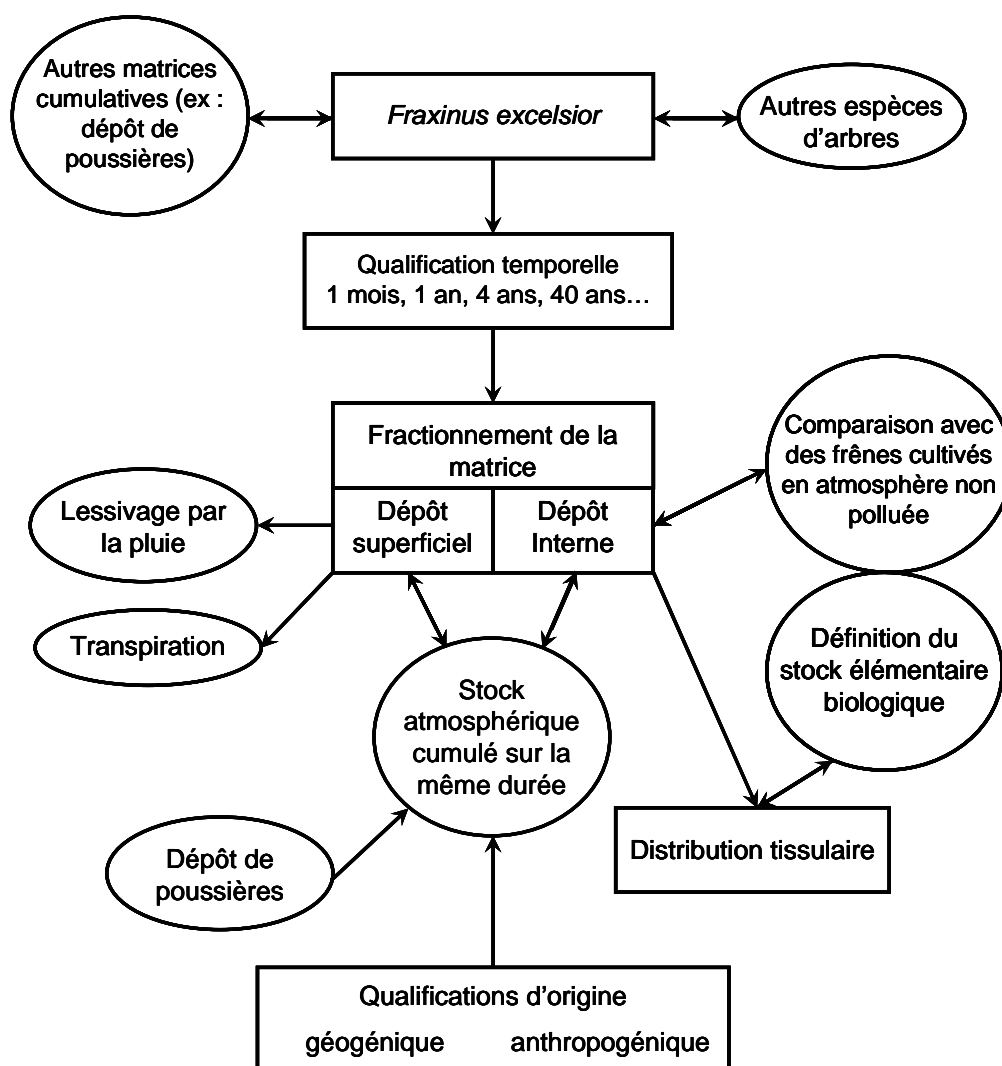


Figure 3.1 : Schéma résumant la stratégie expérimentale choisie

Les différents échantillons obtenus après mise en oeuvre de ce plan de travail sont soumis à plusieurs types d'analyse élémentaire (ICP-MS, PIXE, SEM-EDX, voir matériel et méthodes) (Ayrault *et al.*, 2009) . Le croisement de ces analyses différentes permet d'accéder à 3 types

d'informations : une analyse globale de très grande précision mais destructrice des échantillons (ICP-MS) ; une localisation anatomique et histologique des éléments majeurs (PIXE, SEM-EDX) et une distinction poussée entre éléments rassemblés sous forme particulaire solide et apportés tels quels par l'atmosphère et éléments dispersés (SEM-EDX) (Figure 3.2).

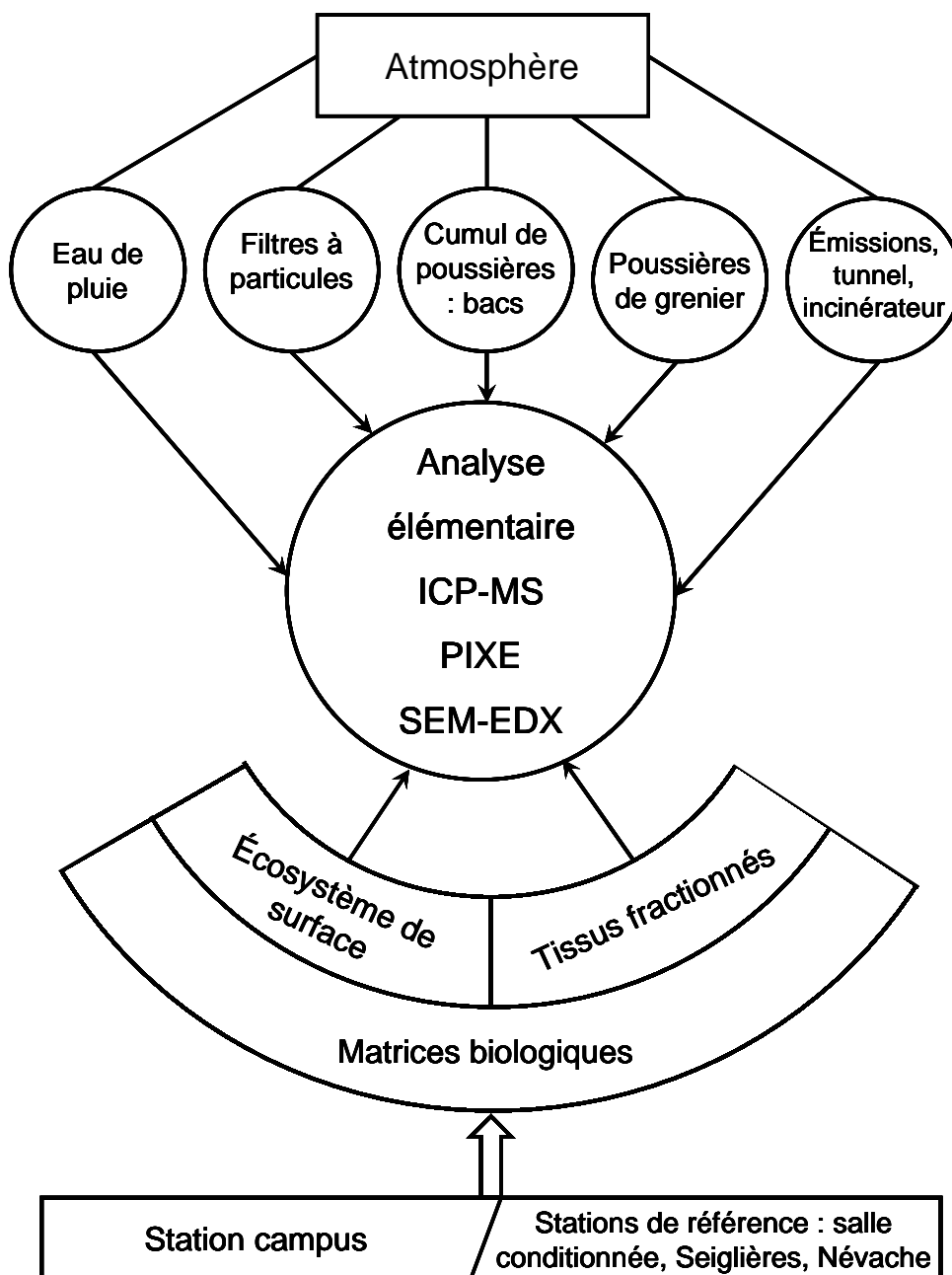


Figure 3.2 : Inventaire des matrices soumises à l'analyse (ICP-MS, PIXE, SEM-EDX) et séparables en 2 ensembles : a) les dépôts plus ou moins directement d'origine atmosphérique, b) l'espèce d'arbre étudié

III.2. Choix de la matrice

Pour répondre à notre problématique d'étude de la pollution atmosphérique élémentaire, à la fois sur des pas de temps long et sur de longues distances, nous avons dû trouver une matrice adaptée. De nombreuses études insistent sur le fait que l'écorce des arbres est un meilleur indicateur de la pollution par les métaux que les lichens, en particulier pour les émissions de plomb par les véhicules motorisés (Barnes *et al.*, 1976 ; Laaksovirta *et al.*, 1976). La matrice qui nous est ainsi apparue la plus attractive, la plus maîtrisable et la plus répandue est l'écorce d'arbre. L'anatomie (matériel et méthodes) et les processus physiologiques en sont connus dans notre laboratoire et ce modèle est largement utilisé (Barnes *et al.*, 1976 ; El Hasan *et al.*, 2002 ; Harju *et al.*, 2002 ; Martin-Dupont *et al.*, 2002 ; Bellis *et al.*, 2003 ; Saarela *et al.*, 2005 ; Suzuki, 2006). Il possède des parties aériennes pérennes en contact permanent avec l'atmosphère, surtout des espaces apoplastiques (ou morts) permettant l'étude de cumuls plus ou moins réversibles. De plus, cette matrice possède une très grande distribution géographique. On retrouve, en effet, des arbres partout, de la plaine jusqu'à des altitudes élevées (environ 2200 m), d'espaces ruraux aux espaces urbains. L'analyse de l'écorce des arbres peut ainsi fournir des informations sur le type et le degré de pollution, les sources d'émissions, et une estimation des apports de polluants sur une longue période de temps pour les différents éléments. Les avantages de la méthode sont les suivants :

- un suivi à long terme est possible, grâce aux parties les plus périphériques de l'écorce de l'arbre qui sont exposées à l'atmosphère pendant une longue période de temps,
- la pollution peut être étudiée sur de vastes zones par la collecte des échantillons d'écorce à grande échelle (Gustke, 1991),
- la surveillance n'est pas limitée à la belle saison car l'écorce est disponible tout au long de l'année,
- la détermination des espèces d'arbres ne pose normalement pas de problème à un biologiste averti. Chez d'autres groupes de plantes utilisées en bioindication, comme les mousses ou les lichens, la détermination des espèces nécessite l'implication de rares spécialistes,
- les arbres sont très ubiquistes : les études peuvent être menées en zones très urbanisées comme dans des ensembles naturels,
- la collecte de l'écorce est facile, surtout lorsque l'échantillon est prélevé à hauteur de poitrine (Karandinos *et al.*, 1985), ce qui est généralement le cas,

- la technique d'échantillonnage n'a pas d'influence sur la vitalité de l'arbre, lorsque seuls les tissus morts sont enlevés, et les prélèvements d'écorce totale sur une surface limitée sont bien tolérés,
- Des prélèvements répétés sur le même arbre sont possibles,
- Le matériel et le temps nécessaire pour la collecte d'échantillons sont relativement modestes.

III.3. Choix de l'espèce

Pour une étude en profondeur, il était impossible de suivre en parallèle plusieurs espèces d'arbres. Une étude liée au programme POVA portant sur les transferts de polluants atmosphériques métalliques a été antérieurement réalisée par notre équipe (2000 à 2005). Lors de cette étude, plusieurs espèces d'arbres avaient été testées comme l'aune, le bouleau, le cerisier, le charme, le châtaignier, le chêne, l'érable, l'épicéa, le frêne, le hêtre, le mélèze, le noyer, le saule, le sorbier et le tilleul. Il nous était apparu que le frêne possède la plus faible absorption racinaire de certains éléments (comme le manganèse), absorption qui pourrait interférer avec les apports atmosphériques et nous gêner dans notre méthode d'estimation de la pollution atmosphérique métallique par les arbres. Un second argument de choix de cette espèce est que l'écorce de frêne est faiblement crevassée, et ce, jusqu'à des âges avancés (environ 25-30 ans). Enfin, cette espèce a été choisie pour sa grande répartition géographique dans notre région. Notre laboratoire possède une plantation de frênes âgés d'une quinzaine d'années, ce qui a grandement facilité la réalisation de nos diverses expérimentations.

III.4. Choix de l'âge des rameaux

Dans cette étude, des rameaux d'âges différents (de 1 à 40 ans) ont été utilisés afin de comprendre la dynamique d'accumulation du dépôt d'origine atmosphérique sur des pas de temps longs. Cependant, pour tenter de comprendre les processus d'intégration des polluants à l'intérieur des différents tissus de la tige, nous nous sommes focalisés sur l'étude du suber de rameaux âgés de 4 ans ou même moins. Les raisons d'un tel choix sont les suivantes : 1) le suber est le tissu de la tige le plus superficiel en contact permanent avec l'atmosphère ; 2) le temps de vie de ses cellules est très court et les cellules mortes restent sur la tige pendant une très longue période de temps. Cette couche de cellules de nature hydrophobe, joue un rôle de

protection, réagit aux événements physico-chimiques (intégration physique, diffusion, partition...) sans réels contrôles biologiques ; 3) la couche de cellules de suber la plus ancienne est située à l'extérieur de la tige ; 4) il a été précédemment démontré que, parmi toutes les couches de tissus, le suber possède les teneurs en éléments d'origine anthropique les plus élevées (Hamp et Höll, 1974 ; Harju *et al.*, 2002). Cela a été confirmé par notre étude (Catinon *et al.*, 2008) et sera traité dans le chapitre V ; 5) la couche de cellules de suber chez des jeunes tiges (âge choisi : 4 ans) représente une gaine continue non perturbée. Cela n'est pas vrai pour des tiges plus anciennes (généralement après 25-30 ans) où des fissures conduisent à la formation de structures très complexes du fait de la réactivation de l'assise subérophellodermique (**Figure 3.3**).

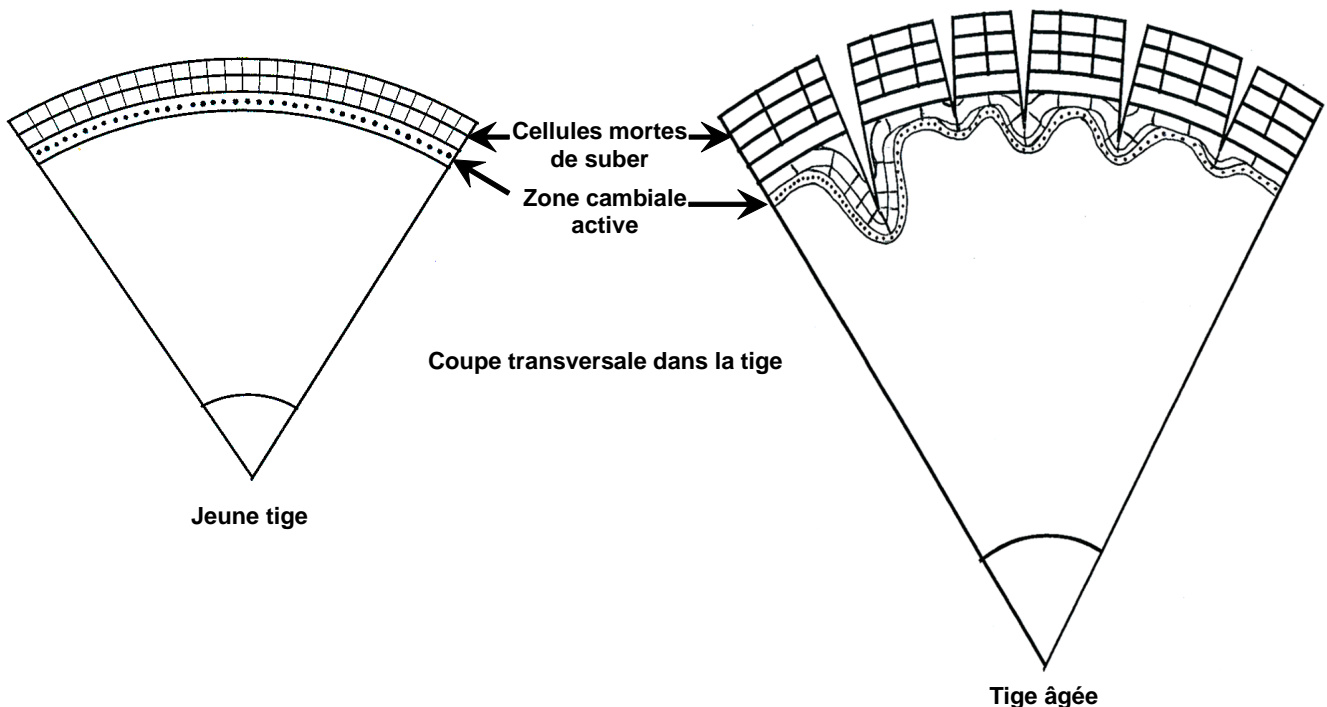


Figure 3.3 : Schéma montrant l'emplacement et la structure de la couche de suber chez les arbres dicotylédones

III.5. Séparation SUR et DANS l'écorce

Le suber est la couche de cellules de la tige qui se trouve à l'interface entre l'air extérieur et les tissus internes de la tige. Durant toute la vie de l'arbre, les rameaux sont soumis à un processus de dépôt atmosphérique dont la dynamique d'accumulation sur la surface de l'écorce (décrite chapitre IV) est fonction de variables telles que les quantités

d'émission et les conditions climatiques. Dans l'optique de comprendre comment fonctionne le modèle arbre dans sa capacité à accumuler et stocker les polluants atmosphériques minéraux d'origine anthropique, il nous est apparu important de différencier le dépôt à la surface de l'écorce de ce qui peut être intégré dans les tissus sous-jacents. C'est pourquoi nous avons mis au point un protocole de lavage de l'écorce à l'eau distillée décrit dans le chapitre "matériel et méthodes". Nous avons constaté que le dépôt de surface possède généralement un plus fort taux de matière minérale que le suber (environ 20% contre 5 à 10% pour le suber). De plus, la constitution et la composition élémentaire de la matière organique qui constituent le dépôt de surface diffèrent assez nettement de celle du suber (cf paragraphes suivants). Ces observations nous ont conforté dans le fait que ces deux fractions devaient être étudiées séparément.

III.6. Le dépôt libre est un écosystème. Comment analyser la partie d'origine anthropique ?

Le dépôt de surface sur les écorces de frêne est principalement composé de matière organique (déchets d'origine animale et végétale, microorganismes, algues, champignons, bactéries...) (**Figure 3.4**) et atteint environ 80% de la masse totale.

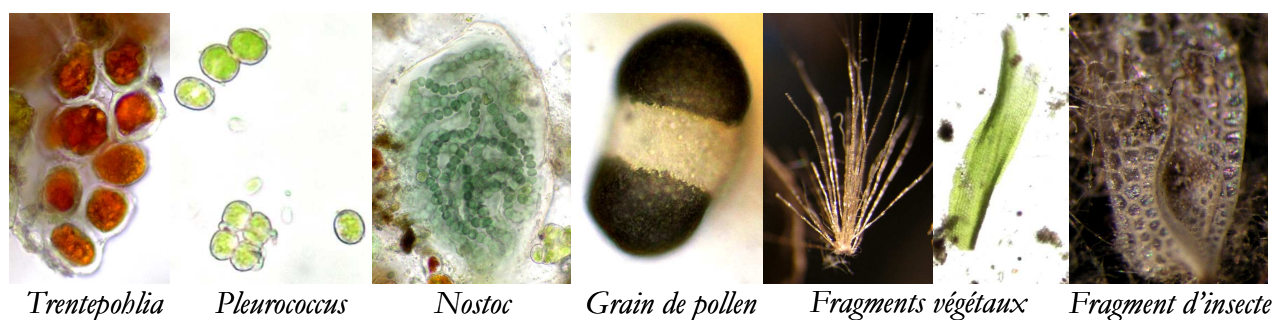


Figure 3.4 : Illustration d'organismes entrant dans la composition du dépôt de surface.

Les deux autres fractions majeures restantes qui constituent le dépôt sont : la fraction géogénique (environ 10% en général) et la fraction d'origine anthropique (environ 10%). On se demande alors comment déterminer la composition élémentaire qualitative et quantitative de la fraction d'origine anthropique sachant que les dosages par ICP-MS nous donnent une concentration élémentaire du dépôt de surface total. La matière organique et la fraction géogénique contiennent des oligoéléments. Toutefois, ces composantes peuvent aussi être

étroitement associées à des éléments d'origine anthropique. Dans ces conditions, l'évaluation des niveaux d'accumulation des éléments polluants présents dans le dépôt est difficile car (1) la quantité de matière organique peut fortement varier d'un point à un autre, en fonction, par exemple, de l'approvisionnement en eau, (2) la partie géogénique peut également être modifiée qualitativement et quantitativement à la suite des événements climatiques (comme la pluie et le vent).

Au niveau des oligoéléments, pour faire la différence entre l'origine naturelle et l'origine anthropogénique, le concept très connu de facteur d'enrichissement (Enrichment factors, EF) est habituellement utilisé. Les concentrations des éléments sont normalisées aux valeurs de la croûte terrestre ou, plus rarement, à des valeurs de sol profond local. Les limites de l'approche par l'EF sont examinées en détails par Reimann et de Caritat (2005).

Notre étude du dépôt sur l'écorce de l'arbre montre clairement que l'utilisation de l'EF doit être abordée avec prudence car dans notre cas, plus de 80% du dépôt est composé de matière organique qui est négligée par le concept d'EF.

Le terme "matière organique" représente principalement des débris végétaux (grains de pollen, poils de feuilles, fragments de cellules...) et des organismes vivants (algues, lichens, champignons...) (**Figure 3.4**) dans lesquels les éléments majeurs (C, H, O, N, K, P, S...) et les éléments mineurs (Mg, Fe, Zn, Cu...) sont naturellement des éléments constitutifs de la matière vivante. Ces éléments sont aussi représentatifs des substances humiques du sol qui possèdent une composition élémentaire comparable à celle des autres matrices organiques.

De la même manière, le mélange des composants géogéniques contient une part de différents éléments qui entrent naturellement dans leur structure (Si, Al, K, Fe, Mg, Ti, Zr...). Le but de notre estimation a été de retirer du bilan des éléments présents dans 1 g de dépôt : 1) la partie des éléments qui entrent normalement dans la constitution de la matière organique et 2) les éléments qui entrent normalement dans la constitution de la fraction géogénique. L'estimation du stock des éléments restants nous permet de mieux représenter la quantité des éléments polluants fournis par l'atmosphère et pour lesquels le nom de "Anthropogenic Atmospheric Elements Fraction" (AAEF), correspondant à la fraction des éléments atmosphériques anthropogéniques, a été choisi (**Figure 3.5**).

Pour tenter d'établir une telle évaluation, des formules de référence devaient être choisies pour la matière organique d'une part et pour la fraction géogénique d'autre part.

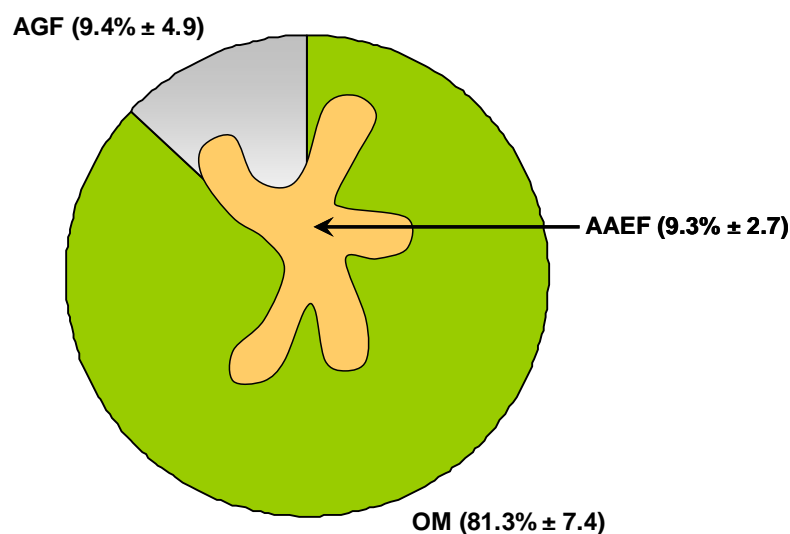


Figure 3.5 : Schéma illustrant la composition du dépôt superficiel (moyenne ± E.T) sur des écorces de frêne (*Fraxinus excelsior*) âgés de 3 à 40 ans et sur des écorces d'arbres âgées de 40 ans (*Populus nigra*, *Betula alba* and *Fagus sylvatica*). n=11. OM, organic matter; AGF, atmospheric geogenic fraction; AAEF, anthropic atmospheric elements fraction.

III.7. Le suber est le tissu le plus contaminé. Comment y différencier les éléments d'origine exogène des éléments issus de l'absorption racinaire ?

Lors de sa formation, la composition élémentaire du suber est exclusivement issue du végétal qui l'a produit. Sur des rameaux âgés de 4 ans, nous avons constaté que les éléments d'origine anthropique étaient en surconcentration dans le suber par rapport aux tissus sous-jacents (cf chapitre V), ce qui suggère une intégration et une accumulation d'éléments issus de l'atmosphère extérieure. Cependant, pour déterminer la composition de la fraction d'origine exogène, nous sommes confrontés au même problème que celui rencontré lors de la détermination de l'AAEF dans le dépôt de surface. Pour résoudre ce problème, nous avons choisi comme référence la composition du suber des frênes témoins cultivés en salle conditionnée (**Tableau 3.1**). La composition de la fraction exogène sera retrouvée par déduction en appliquant le même principe que pour la détermination de l'AAEF dans le dépôt de surface. Par ailleurs, nous avons appliqué au suber les principes du calcul de l'AAEF utilisés pour le dépôt libre (voir chapitre VI).

Tableau 3.1 : Composition élémentaire (en $\mu\text{g.g}^{-1}$) du suber de frêne. Composition de référence établie par l'analyse de suber de frêne cultivé en salle conditionnée.

Elément	Suber
K	39000
Ca	4600
Mg	2200
Mn	159
Fe	24
Zn	22
Al	20
Ti	19
Ba	6,6
Cu	4,4
Ni	1,0
Cd	0,4
Pb	0,3
Co	0,15
Cr	0,14
As	0,12
Ag	0,07
V	0,03
Sb	0,02
Se	0,02

III.8. Eléments sous forme dispersée ou ionique ou sous forme particulière ? Etude par l'imagerie SEM-EDX et PIXE

L'ICP-MS est une méthode destructive qui nécessite une digestion de l'échantillon (cf matériel et méthodes). Cette méthode de routine nous fournit une concentration très précise ($\mu\text{g.g}^{-1}$) d'un grand nombre d'éléments présents dans l'échantillon. Cependant, il nous est impossible, avec cette seule méthode, d'affirmer si l'intégration des éléments dans le dépôt ou le suber se fait sous forme dispersée, éventuellement ionique et/ou sous forme particulière. Les méthodes d'imagerie proposées par les méthodes PIXE et SEM-EDX permettent aisément de mettre en évidence la présence de particules dans un échantillon, qui sont représentées par un spot coloré avec le PIXE et par une luminosité généralement forte de l'objet avec le SEM-EDX. Les cartographies que nous donnent ces deux méthodes nous permettent aussi de déterminer si l'élément considéré est sous forme dispersée ou particulière. De tels résultats seront traités dans les chapitres suivants.

Chapitre IV

Etude des dépôts atmosphériques superficiels non intégrés dans les tissus des troncs. Comparaison avec des dépôts sur des matrices inertes

Sommaire

IV.1. Introduction.....	92
IV.2. Matériel et méthodes.....	93
IV.3. Résultats	94

IV.1. Introduction

La décision d'analyser la bioaccumulation des constituants élémentaires atmosphériques par les tissus des troncs d'arbres nécessitait de clarifier d'emblée les caractéristiques des événements impliqués dans le transfert atmosphère/tissus des tiges considérées globalement. La **Figure 4.1** résume le plus simplement possible les hypothèses initialement formulées à ce sujet.

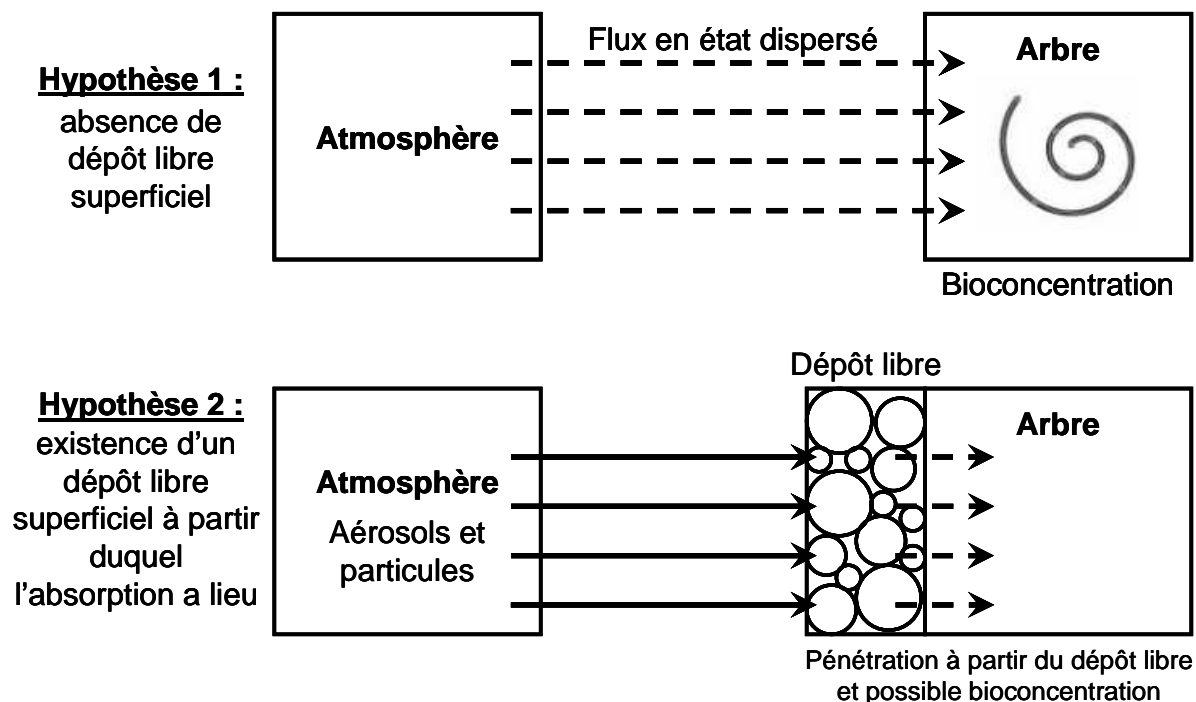


Figure 4.1 : Hypothèses sur les étapes de transfert des éléments de l'atmosphère vers l'arbre.

L'existence d'un dépôt libre sur les écorces faisant peu de doute, on peut constater, dans les zones fortement polluées, l'existence d'une couche de surface très sombre du fait de résidus de combustion. Par ailleurs, différents auteurs avaient antérieurement séparé des "dépôts libres" de ce type (Hamp et Höll, 1974).

Cependant, la composition et le rôle joué par ce dépôt n'étaient pas connus. Nous avons donc entrepris à ce sujet :

- la mise au point d'une méthode d'obtention du dépôt de surface,
- la cinétique de formation et d'augmentation du dépôt de surface et les processus de lessivage,
- l'étude de la composition du dépôt de surface,
- la comparaison avec le mélange élémentaire internalisé,

- e) la formulation d'hypothèses sur les mécanismes de transfert dépôt de surface/stockage interne,
- f) l'étude de l'existence d'une externalisation élémentaire vers le dépôt de surface à partir de la sève brute des arbres.

IV.2. Matériel et méthodes

IV.2.1. Mise au point d'une méthode d'obtention du dépôt de surface

Sur des tiges de plus d'un an, la limite externe du végétal correspond au suber chez le frêne comme chez les autres dicotylédones pérennes et les gymnospermes. Il s'agit donc d'une ou plusieurs couches de cellules mortes, jointives, aux parois épaisses, mécaniquement résistantes et imprégnées de subérine. Le suber constitue ainsi une "frontière" nette entre l'atmosphère et les espaces symplasmiques.

Après des essais de brossage à sec qui nous ont paru insuffisants, par observation à la loupe binoculaire ($G=40$), nous avons choisi un brossage souple, en phase humide décrit dans le chapitre II (**Figure 2.7**).

Ce protocole a l'avantage de mobiliser le dépôt libre dans les zones à surface complexe (lenticelles, nœuds, insertions pétiolaires...). Il fournit des particules facilement sédimentables par centrifugation (choix : 8000 rpm) et une solution aqueuse. Les compositions élémentaires de ces deux fractions ont été établies et comparées (voir ci-après). L'éventualité d'une extraction, par ce lavage, d'une partie des éléments les plus hydrosolubles présents dans le suber ne peut être exclue, et, en tout premier chef, dans le cas du potassium. Cependant, eu égard à l'imperméabilité de la subérine, cette perte nous est apparue, au niveau des dosages, comme acceptable.

IV.3. Résultats

IV.3.1. Etude de la composition du dépôt superficiel

IV.3.1.1. Etude comparée du dépôt de surface de 7 espèces d'arbres

Le dépôt de surface prélevé sur des frênes âgés de 5 à 40 ans a été comparé à celui de 6 autres espèces d'arbres âgés de 40 ans présents sur la station. Une comparaison avec deux dépôts foliaires fut également effectuée (**Tableau 4.1**).

La masse de matière sèche moyenne du dépôt sur les troncs étudiés par unité de surface (mg/dm^2) atteint une valeur proche de $70 \text{ mg}/\text{dm}^2 \pm 50$. Environ $22\% \pm 10$ sont constitués de minéraux. La teneur moyenne en matière organique des dépôts est de 78% de la masse totale. Sur les feuilles de durée de vie pluriannuelle étudiées (*Prunus laurocerasus* et *Magnolia grandiflora*), les dépôts sont plus faibles que sur les troncs. Chez le frêne étudié entre 5 et 40 ans, il n'y a pas de croissance linéaire de la masse du dépôt par unité de surface en fonction de l'âge (**Figure 4.2**). Les différences de masse déposées sur l'écorce en fonction de l'espèce à âge égal ont une amplitude observée supérieure à 10 (*Populus nigra* / *Paulownia imperialis*).

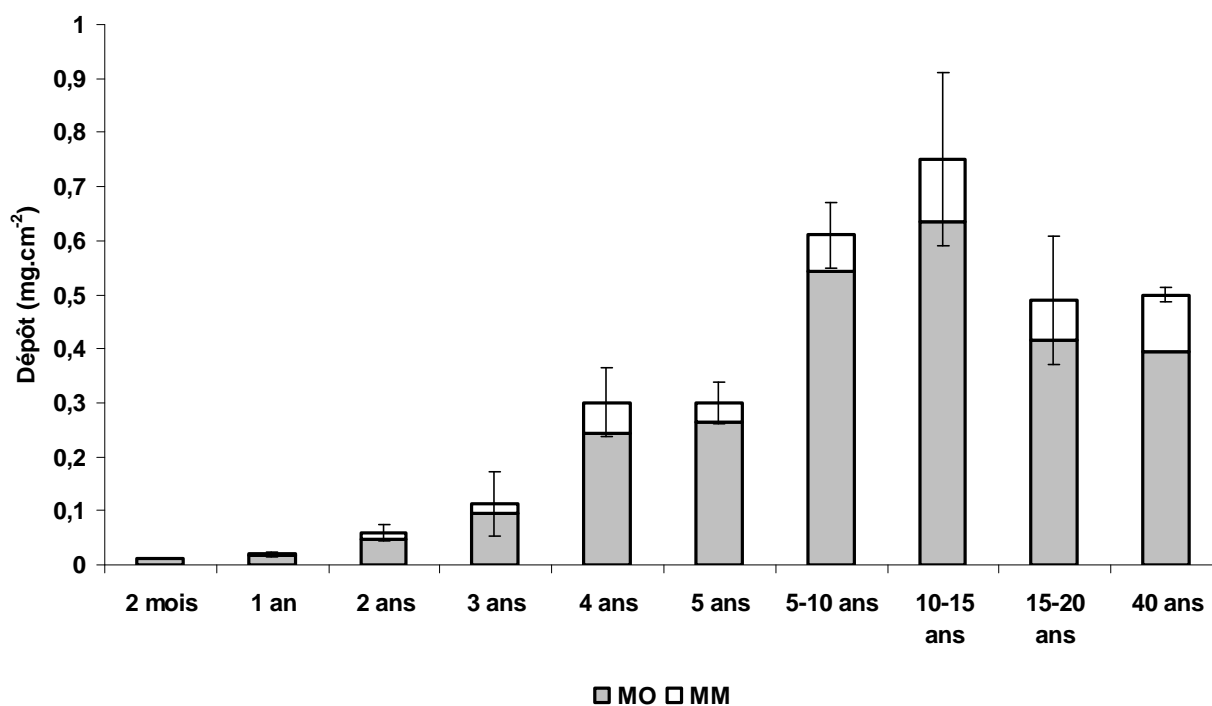
IV.3.1.2. Cinétique de formation et d'accumulation du dépôt superficiel chez le frêne

Une étude détaillée de la cinétique d'accumulation du dépôt de surface a été réalisée sur le frêne, entre 2 mois et 40 ans (**Figure 4.2**).

Tableau 4.1 : Masse sèche du dépôt total (par dm^2) et du contenu minéral sur les troncs et les feuilles

Espèces	Age (années)	Organe	M.S (mg/dm^2)	Contenu minéral (mg/dm^2)	M.M/M.S (%)
Vitre	40	-	199	69	35
<i>Fraxinus excelsior</i>	40	écorce (n=2)	50 ± 1	10 ± 4	21
	15-20	écorce	35,1	5,1	14
	10-15	écorce	87,9	12,4	14
	5-10	écorce	144	14,4	10
<i>Betula alba</i>	40	écorce	55	11,5	21
<i>Fagus sylvatica</i>	40	écorce	65	18	28
<i>Populus alba</i>	40	écorce	163	18	11
<i>Populus nigra</i>	40	écorce	68	20	29
<i>Prunus</i>	40	écorce	18,9	7,4	39
<i>laurocerasus</i>					
<i>Paulownia</i>	40	écorce	10,6	1,9	18
<i>imperialis</i>					
Moyenne pour les arbres			69,8	11,9	21,8
Ecart type			49,9	5,9	9,8
Feuilles					
<i>Prunus</i>	5	feuilles	2,9	1,2	4,2
<i>laurocerasus</i>					
<i>Magnolia sp</i>	5	feuilles	18,9	4,6	24

M.S : Masse sèche ; M.M : Masse Minérale

Figure 4.2 : Masse sèche moyenne ($n = 3$) du dépôt par unité de surface en fonction de l'âge des rameaux de frêne. MO : Matière Organique; MM : Matière Minérale.

On assiste à une progression de la masse/dm² jusqu'à 10-15 ans qui ne se poursuit pas par la suite. La matière organique représente toujours l'essentiel de la masse du dépôt. Cependant, le rapport masse minérale/masse de matière organique semble plus élevé dans les dépôts âgés (Tableau 4.2).

Tableau 4.2 : Etude du rapport masse des éléments/masse organique dans le dépôt de surface sur écorce de frênes âgés de 2 mois à 40 ans

	2 mois	1 an	2 ans	3 ans	4 ans	5 ans	5-10 ans	10-15 ans	15-20 ans	40 ans
MM/MO	0,20	0,20	0,21	0,20	0,23	0,14	0,12	0,18	0,18	0,27

MO : Matière Organique; MM : Matière Minérale

IV.3.1.3. Composition élémentaire des dépôts superficiels chez le frêne

Des analyses ICP-MS ont porté sur des dépôts superficiels d'âges différents (Tableaux 4.3, 4.4 et 4.5).

Tableau 4.3 : Concentration des éléments (µg.g⁻¹) dans le dépôt sur l'écorce de frêne de 1 à 5 ans

	> 1000 µg.g ⁻¹	1000> >100 µg.g ⁻¹	100> > 10 µg.g ⁻¹	<1 µg.g ⁻¹
MO	843000 ± 33000	Zn 308 ± 109	V 76 ± 19	La 7 ± 3
Al	11200 ± 4200	Ti 230 ± 172	Sr 62 ± 19	Co 6 ± 2
Fe	9600 ± 3100	Cu 164 ± 56	Pb 58 ± 16	As 6 ± 1
		Mn 164 ± 48	Ni 45 ± 8	Cd 2 ± 1
		Ba 152 ± 49	Cr 42 ± 14	Sb 1 ± 1
			Rb 26 ± 10	Sn 0,4 ± 0,4

MO : Matière Organique

Tableau 4.4 : Concentration des éléments (µg.g⁻¹) dans le dépôt sur l'écorce de frêne de 5 à 20 ans

	> 1000 µg.g ⁻¹	1000> >100 µg.g ⁻¹	100> > 10 µg.g ⁻¹	10 > >1 µg.g ⁻¹
MO	872000 ± 25000	Ti 978 ± 141	Ba 66 ± 18	Ni 9,8 ± 1,7
Si	33500 ± 8600	Na 663 ± 576	Cu 28 ± 5	Sb 3,9 ± 0,8
Ca	9600 ± 2100	Mn 267 ± 71	Cr 25 ± 6	La 3,8 ± 0,5
Al	9400 ± 1300	Zn 187 ± 50	Sr 24 ± 5	Sn 3,7 ± 0,4
Fe	7400 ± 1200		Zr 23 ± 4	Co 3,4 ± 0,7
K	6600 ± 400		Pb 13 ± 2	As 2,2 ± 0,8
P	4900 ± 100		V 10 ± 2	Mo 1,5 ± 0,6
Mg	2500 ± 300		Rb 10 ± 1	Cd 0,3 ± 0,2

MO : Matière Organique

**Tableau 4.5 : Concentration des éléments ($\mu\text{g.g}^{-1}$)
dans le dépôt de deux échantillons d'écorce de frêne de 40 ans**

> 1000 $\mu\text{g.g}^{-1}$			1000 >> 100 $\mu\text{g.g}^{-1}$			100 >> 10 $\mu\text{g.g}^{-1}$			10 >> 1 $\mu\text{g.g}^{-1}$		
	E1	E2		E1	E2		E1	E2		E1	E2
MO	690000	880000	Zn	446	246	Sr	88,5	90,4	Sb	12,2	3,4
Si	102000	24000	Mn	365	122	Zr	76,5	25,0	La	11,8	3,5
Ca	18700	22800	Ba	269	168	Cr	76,2	16,8	Sn	10,5	3,6
Al	26000	6300	Cu	111	199	Pb	52,6	6,5	Co	9,3	4,0
Fe	17700	4400				V	36,6	11,2	As	7,1	2,7
K	10000	6300				Rb	36,0	11,6	Mo	5,6	1,3
P	4400	4400				Ni	28,5	12,3	Cd	0,5	0,4
Mg	5300	2500									
Na	3300	700									
Ti	2400	600									
Total	879800	952000		1191	735		395	174		57	19
%	99,8	99,9		0,14	0,08		0,04	0,02		0,01	0,00

MO : Matière Organique ; E1 : Echantillon 1 ; E2 : Echantillon 2

Parmi ces trois séries d'analyses faites sur des échantillons d'âge différent, seules les analyses du dépôt de 40 ans et de 5-20 ans ont fait l'objet de l'étude complète des éléments majeurs (Si, Ca, Al, K, P, Mg, Na). L'expression en concentrations ($\mu\text{g.g}^{-1}$) est étroitement dépendante de la teneur en matière organique présente qui est le déterminant essentiel de la masse sèche. A partir de ce type de données, il est intéressant d'exprimer les variations quantitatives des éléments entre eux. Pour cela, en tous cas pour tous les éléments dosés dans les 3 séries de mesures, on peut étudier les fluctuations de ces rapports et analyser celles qui peuvent être attribuées à des différences spatiales des dépôts, à des expositions plus ou moins marquées, au lessivage ou, enfin, à des évolutions éventuellement marquées dans la composition de l'atmosphère au cours du temps (**Tableau 4.6**).

Tableau 4.6 : Part de chaque élément dans le dépôt de surface (% exprimés sur le total des concentrations des éléments communs aux 3 séries de dosages)

	1-5 ans	5-20 ans	40 ans (E1)	40 ans (E2)
Al	50,6	51,0	54,6	51,6
Fe	43,3	40,1	37,1	36,1
Zn	1,4	1,0	0,9	2,0
Ti	1,0	5,3	5,0	4,9
Cu	0,7	0,2	0,2	1,6
Mn	0,7	1,4	0,8	1,0
Ba	0,7	0,4	0,6	1,4
V	0,3	0,05	0,08	0,09
Sr	0,3	0,1	0,2	0,7
Pb	0,3	0,07	0,1	0,05
Ni	0,2	0,05	0,06	0,1
Cr	0,2	0,1	0,2	0,1
Rb	0,1	0,05	0,08	0,1
La	0,03	0,02	0,02	0,03
Co	0,03	0,02	0,02	0,03
As	0,03	0,01	0,01	0,02
Cd	0,01	0,001	0,001	0,003
Sb	0,005	0,02	0,03	0,03
Sn	0,002	0,02	0,02	0,03

Pour le dépôt de 40 ans, deux échantillons de 4 dm² ont été prélevés à 2 m de hauteur sur deux branches opposées de manière à illustrer la dépendance des quantités déposées par unité de surface vis-à-vis de l'orientation et de la position globale sur le tronc. Les échantillons E1 et E2 obtenus diffèrent clairement par leur richesse en matière organique (69% contre 88%). Il correspond à cela des différences marquées de teneurs en éléments (**Tableau 4.7**) qui sont en faveur de E1 pour les éléments d'origine supposée anthropique (Pb, Cr, Mo, Ni, Ti, V) ou supposée géogénique (Si, Al, Mg, Ti, Zr). Ces différences sont, au contraire, en faveur de E2 pour les éléments qui contribuent fortement à la constitution de la matière organique (Ca, K, P, Cu, Zn, Mg). Ces différences sont d'autant plus nettes qu'elles sont calculées, non à partir des teneurs par rapport à la masse de matière sèche, mais à partir de la masse de cendres (colonne de droite).

Tableau 4.7 : Différences du rapport des éléments entre deux échantillons d'écorce de frêne de 40 ans

éléments	E1/E2*	E'1/E'2**
Al	4,1	1,6
As	2,6	1,0
Ba	1,6	0,6
Ca	0,8	0,3
Cd	1,3	0,5
Co	2,3	0,9
Cr	4,6	1,8
Cu	0,6	0,2
Fe	4,1	1,6
K	1,6	0,6
La	3,4	1,3
Mg	2,1	0,8
Mn	3,0	1,2
Mo	4,3	1,7
Na	4,6	1,8
Ni	2,3	0,9
P	1,0	0,4
Pb	8,0	3,1
Rb	3,1	1,2
Sb	3,6	1,4
Si	4,2	1,6
Sn	2,9	1,1
Sr	1,0	0,4
Ti	4,0	1,6
V	3,3	1,3
Zn	1,8	0,7
Zr	3,1	1,2

* E1/E2 = rapport des concentrations (µg/g) par unité de masse sèche

** E'1/E'2 = rapport des concentrations (µg/g) par unité de masse de cendres

IV.3.1.4. Fraction hydrosoluble et fraction centrifugeable au sein du dépôt de surface

Les analyses globales des dépôts de surface ne font pas apparaître ce qui revient à une phase solide, centrifugeable et ce qui revient à la solution aqueuse. L'étude séparée de ces deux phases était donc nécessaire. Le **Tableau 4.8** résume les résultats obtenus, qui démontrent que le culot rassemble l'essentiel des éléments étudiés. Cependant, les éléments les plus solubles dans l'eau (Sn, Sb, Cu, Zn...) présentent les teneurs les plus élevées dans la solution aqueuse, donc en phase dispersée. Cela est particulièrement net pour Sn qui n'est cependant présent qu'en concentration faible dans le dépôt (0,4 à 10,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$). C'est très net également pour le couple Cu/Zn (12-13% dans l'eau) alors que le contenu du dépôt, spécialement pour le zinc, est clairement élevé (entre 200 à 450 $\mu\text{g.g}^{-1}$).

Tableau 4.8 : Relation quantitative (culot/dépôt %) entre le culot et le dépôt initial pour chaque élément

élément	1 an	2 ans	3 ans	4 ans	5 ans	5-10 ans	10-15 ans	15-20 ans	Moyenne \pm E.T	classement
Si	n.a. ^b	n.a. ^b	n.a. ^b	n.a. ^b	n.a. ^b	99,3	99,4	99,6	99,4 \pm 0,1	95-100
Al	97,0	97,4	99,0	99,3	99,2	98,0	98,6	99,0	98,4 \pm 0,9	
V	97,6	99,2	99,3	99,2	99,6	96,4	97,1	97,9	98,3 \pm 1,2	
Fe	95,2	96,8	98,6	98,9	98,8	98,0	98,6	99,0	98,0 \pm 1,3	
Ce	94,8	96,7	98,7	98,9	99,0	96,8	97,6	98,2	97,6 \pm 1,4	
Cs	95,0	96,5	98,3	99,0	99,1	ild ^a	ild ^a	ild ^a	97,6 \pm 1,8	
Cr	94,4	95,7	98,3	98,8	98,6	ild ^a	98,1	blq ^a	97,3 \pm 1,8	
Sm	93,1	95,5	98,6	98,5	98,7	97,6	98,3	98,4	97,3 \pm 2,0	
La	94,6	96,5	98,6	98,9	98,7	96,0	96,7	97,5	97,2 \pm 1,5	
Pb	96,3	97,1	98,7	98,7	98,7	94,1	96,2	blq ^a	97,1 \pm 1,7	
Ba	92,7	94,3	97,4	97,9	98,0	95,2	96,6	97,6	96,2 \pm 2,0	
Th	86,9	95,0	97,2	97,6	97,4	97,0	98,0	98,3	95,9 \pm 3,8	
Ti	82,9	97,5	94,4	94,3	97,6	99,2	99,5		95,1 \pm 5,8	
Ni	93,7	95,6	96,6	96,9	97,9	90,8	92,8	94,1	94,8 \pm 2,4	90-95
Cd	95,4	92,0	95,5	95,5	96,6	82,8	ild ^a	ild ^a	93,0 \pm 5,2	
Co	89,3	90,5	94,8	93,8	95,8	91,2	91,5	95,1	92,8 \pm 2,4	
Mn	88,7	89,1	93,2	91,8	95,0	93,3	93,4	97,0	92,7 \pm 2,8	
U	80,2	88,8	94,0	95,3	92,9	94,1	93,5	96,2	91,9 \pm 5,2	
Rb	85,4	89,0	94,0	94,7	94,5	86,2	89,1	91,5	90,5 \pm 3,7	
Mo	n.a. ^b	n.a. ^b	n.a. ^b	n.a. ^b	n.a. ^b	83,1	91,1	93,3	89,2 \pm 5,3	89-90
Zn	79,6	83,3	90,6	89,6	91,8	88,2	90,9	92,3	88,3 \pm 4,5	
Sr	74,0	79,6	90,1	91,9	92,9	88,3	89,3	89,4	86,9 \pm 6,6	
Cu	80,2	84,2	91,2	89,2	88,6	77,8	87,6	96,7	86,9 \pm 6,1	
As	75,0	ild ^a	92,7	92,2	ild ^a	ild ^a	ild ^a	ild ^a	86,6 \pm 10,1	
Sb	59,3	90,5	74,5	67,5	84,9	97,3	98,1	98,6	83,8 \pm 15,1	< 85
Sn	1,5	53,8	11,3	ild ^a	ild ^a	93,5	96,5	97,7	59,0 \pm 44,1	
Rapport P/D ^c	84,4	86,4	88,6	87,1	88,7	88,9	90,6	91,1	86,0 \pm 8,4	

^a inférieur aux limites de détection

^b non analysé

^c rapport de masse culot/dépôt (%)

IV.3.1.5. Analyse PIXE et SEM-EDX du dépôt superficiel

L'analyse élémentaire du dépôt grâce à l'ICP-MS nous donne une identification précise des éléments et une détermination de leur concentration. Cependant, la localisation histologique et les structures ayant une composition élémentaire spécifique ne sont pas discernées. Cela justifie notre choix de couplage des différentes méthodes d'analyses qui nous permettent d'avoir plus d'information sur le matériel étudié.

La **Figure 4.3** illustre la répartition de 6 éléments (Ca, K, Mn, Fe, Zn et Cu) analysés par la méthode PIXE lors de l'observation d'un dépôt de surface échantillonné sur un frêne de 4 ans.

L'échelle colorimétrique située à droite de chaque image nous donne une concentration en unités arbitraires allant du bleu (concentration la plus faible) jusqu'au vert (concentration la plus forte).

Les images du calcium et du potassium nous donnent des concentrations homogènes (environ 40 unités arbitraires (u.a) pour Ca et 12 u.a pour K. On distingue des zones plus concentrées (jusqu'à 115 pour Ca et 25 pour K) qui semblent correspondre à des particules pour Ca et à des agrégats pour K.

Pour Mn, Fe, Zn et Cu, les concentrations sont hétérogènes et les fortes concentrations sont sous forme particulaire (particules bien visibles pour le fer). Sur l'image du fer, une zone plus concentrée est bien visible (dans l'encadré) d'une taille de 45 μ m de diamètre (environ 130 u.a), mais il est difficile de dire s'il s'agit d'une particule ou d'un agrégat. En reportant la même zone aux cartes des autres éléments, on retrouve une concentration plus élevée pour le manganèse qui possède d'ailleurs d'autres zones communes avec le fer (dans les cercles) qui correspondent à des particules. La situation est plus ambiguë pour Zn et Cu et ne semble pas être retrouvée pour Ca et K. Il s'agirait donc de particules multiélémentaires qui contiendraient du fer et du manganèse d'origine atmosphérique très probable (ainsi que d'autres éléments qui n'apparaissent pas dans ce dosage). Cette méthode nous donne donc une cartographie de la répartition des éléments dans le dépôt mais la limite de sensibilité de cette méthode est rapidement atteinte pour les éléments sous forme de trace. De plus, elle ne nous permet pas d'observer directement les particules intégrées au dépôt (mais une image transformée) et présente une trop faible résolution.

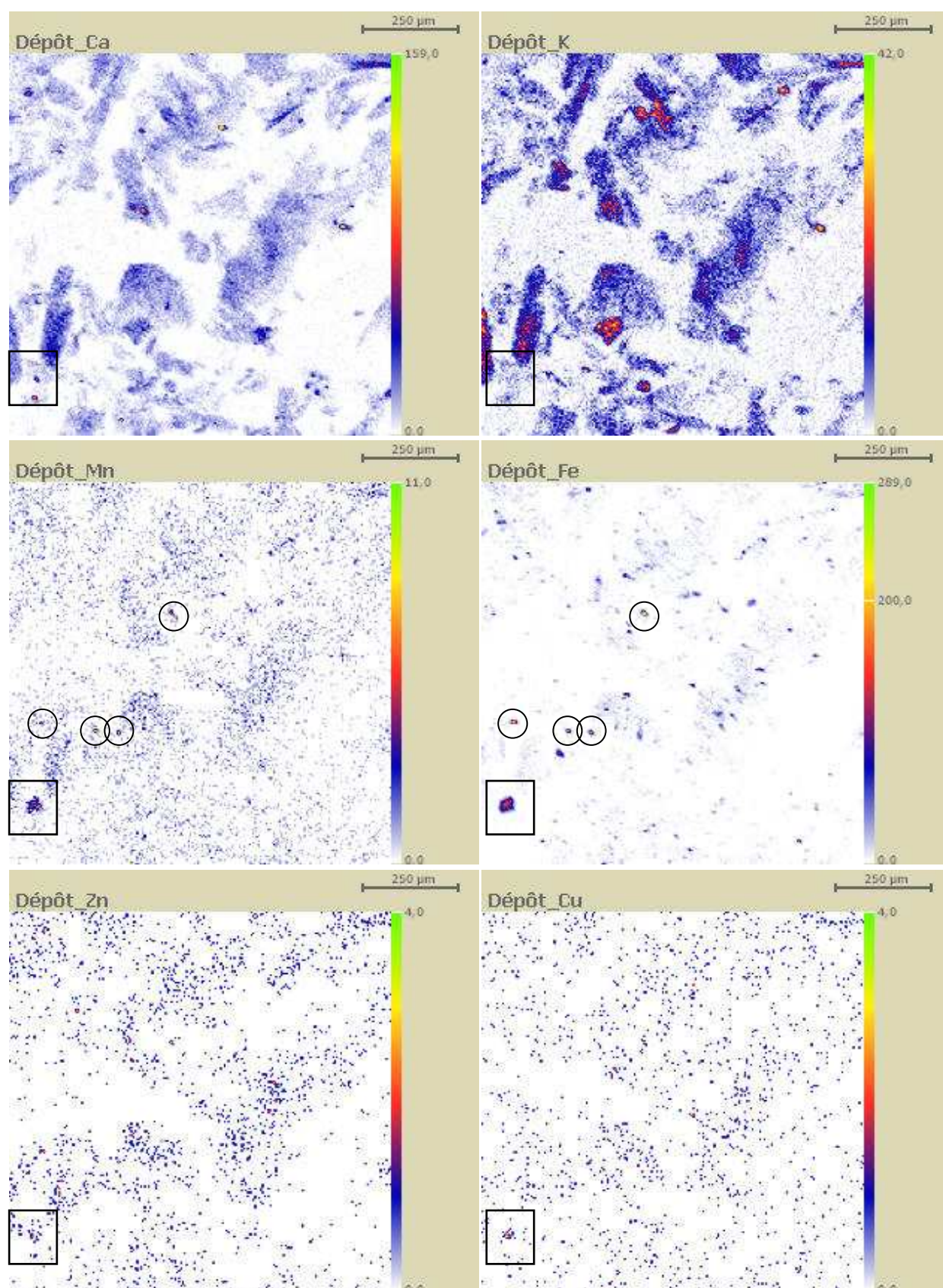


Figure 4.3 : Analyse PIXE de 6 éléments : Ca, K, Mn, Fe, Zn et Cu sur un dépôt obtenu par lavage de l'écorce d'un frêne de 4 ans. Les concentrations sont données en unité arbitraire sur le côté droit des images PIXE. Charge : 5,8476 µC ; pas du faisceau : 5×5 µm ; surface analysée : 1000×1000 µm.

La **Figure 4.4** représente un cliché (obtenu avec un microscope électronique à balayage) de la surface de l'écorce d'une tige de frêne de 4 ans non lavée. Grâce à la technique SEM-EDX, on peut sélectionner des particules sur le champ étudié et obtenir un spectre qui traduit le profil élémentaire de la particule en question (grâce à l'émission de rayons X) (**Figure 4.6**).

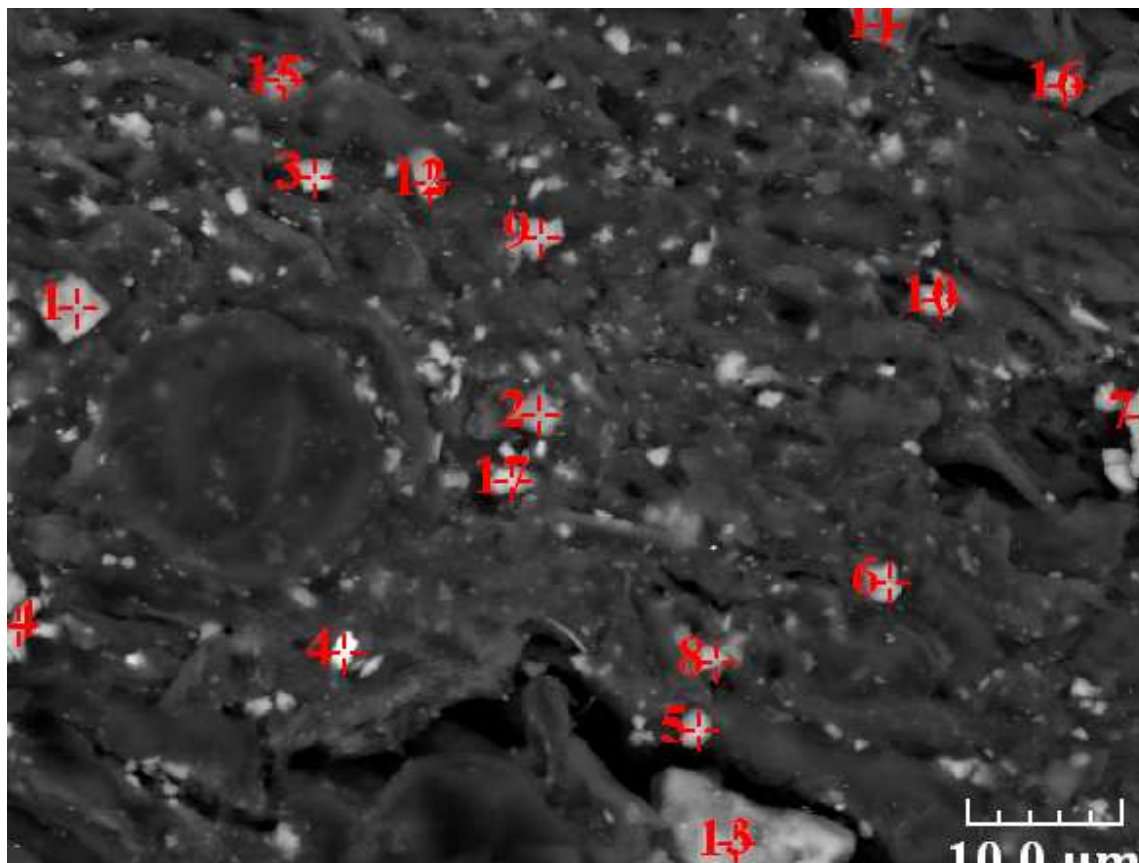


Figure 4.4 : Surface de l'écorce d'une tige de frêne de 4 ans observé au microscope électronique à balayage, illustration du dépôt de surface (grossissement $\times 1800$).

Le dépôt de surface est un mélange complexe de composés inorganiques, aussi bien sous une forme solide qu'associée à de la matière organique, plus ou moins étroitement liée à elle ou adsorbée sur les dérivés de silice d'origine géogénique tels que des argiles.

La structure des particules inorganiques solides, avec une composition relativement simple peut être facilement identifiée par SEM-EDX (**Figure 4.4**). Dans cette matrice, de nombreuses particules plus ou moins brillantes sont visibles. Leur taille est comprise entre 1 et 15 μm . L'émission de rayons X a été obtenue avec l'EDX pour les trois plus grosses particules présentes dans la photographie. Comme le montre la **Figure 4.5**, la particule 4 est composée de fer, de calcium et de silicate, la particule 8 est une particule riche en calcium (calcite) et la particule 11 est un silicate d'alumine (mullite).

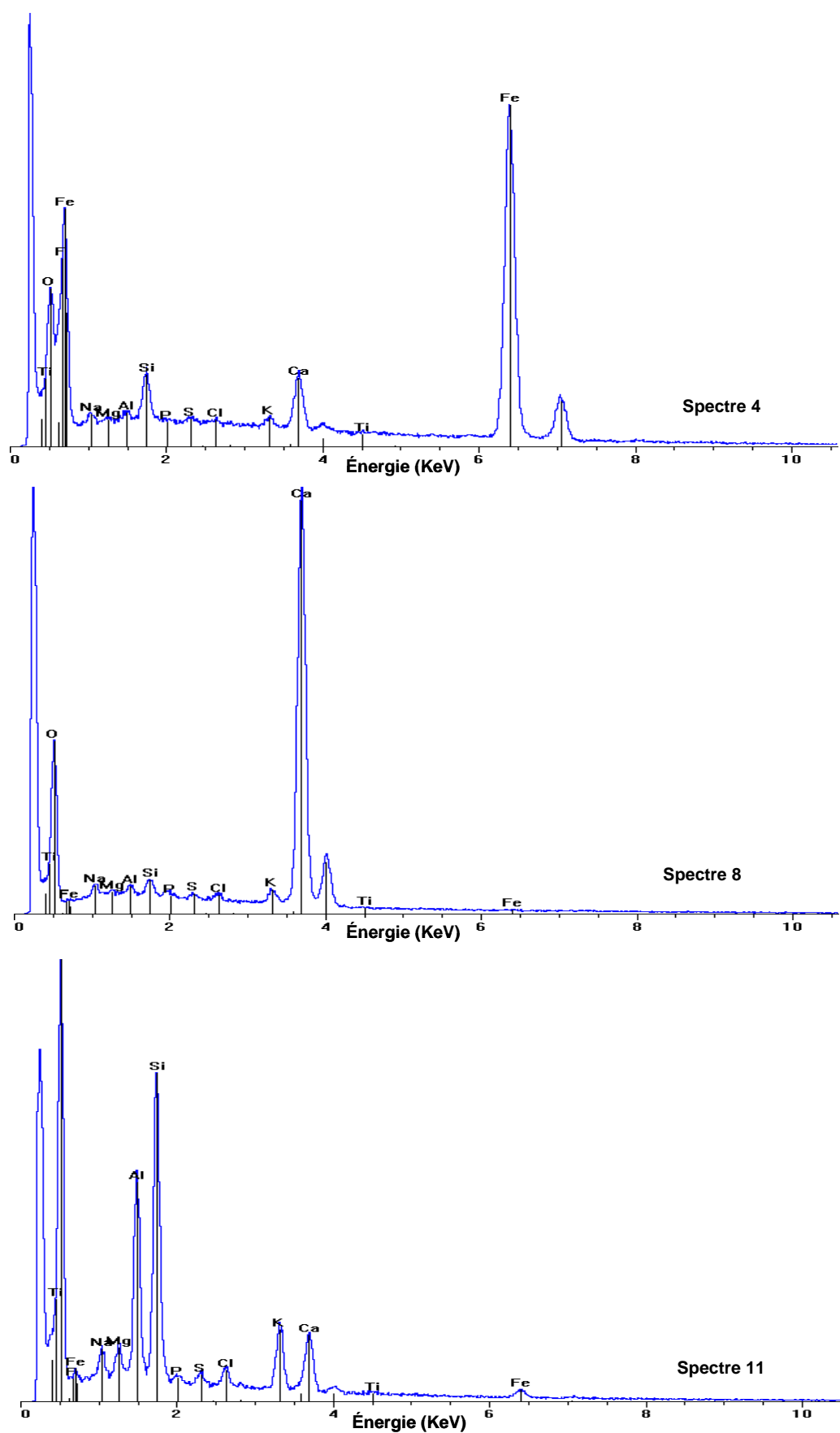


Figure 4.5 : Spectres d'émission de rayons X de 3 particules analysées par SEM-EDX dans le dépôt de surface (indiqués par les numéros 1 à 17 dans la figure 4.4).

La plupart des particules observées dans cette carte se composent de calcium, comme la particule 8 avec une origine géogénique très probable.

Deux groupes de particules inorganiques peuvent être détectés par SEM-EDX : les minéraux d'origine géogénique, d'une part, et les contaminants atmosphériques d'origine anthropique, d'autre part. Pour certains de ces éléments, leur origine peut être beaucoup plus ambiguë. C'est le cas, par exemple, du fer. Des particules sphériques (cendres volantes) ont de toute évidence été formées à haute température par la fonte des éléments les constituant. Certaines sont composées soit de silicate d'alumine (mullite) ou encore de fer métallique (Yue *et al.*, 2006). Nous avons observé une des cendres volantes composées de silice dans le dépôt de surface débarrassée de sa matière organique par un traitement à l'eau oxygénée (H₂O₂) d'un frêne âgé de 4 ans (**Figure 4.6**).

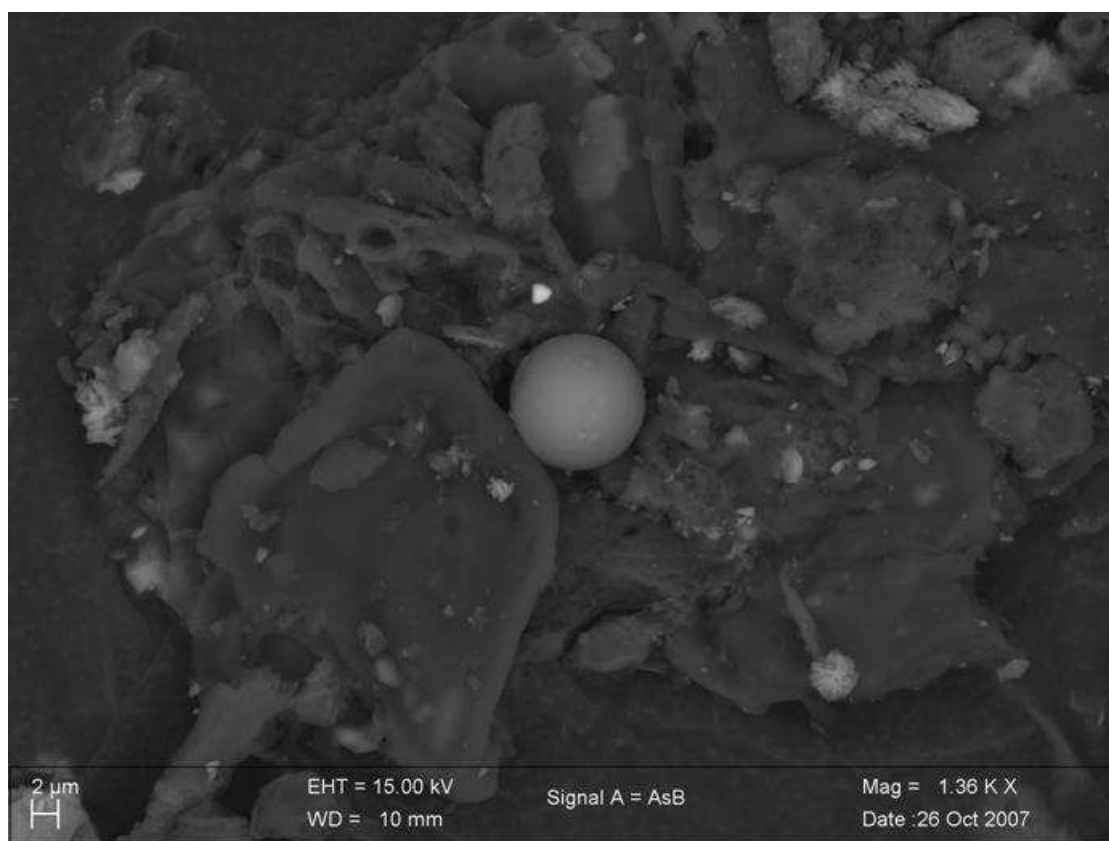


Figure 4.6 : cliché d'un dépôt de surface après traitement à l'eau oxygénée (H₂O₂) d'une écorce de frêne de 4 ans (SEM-EDX, grossissement × 1360).

Notre étude montre de nombreuses particules composées de Si, Al et Ca. Si, Si et Al entrent dans la composition de l'argile ; le calcium est un élément majeur du sol. Le résultat SEM-EDX est cohérent avec l'analyse ICP-MS du dépôt (**Tableaux 4.3, 4.4 et 4.5**) où Si, Al et Ca sont les éléments les plus concentrés dans le dépôt de surface. Ce résultat montre l'influence de la contamination d'origine géogénique dans le dépôt libre.

IV.3.1.6. Possibilités de sortie des éléments hors des tissus des tiges de troncs

Le dépôt superficiel est toujours majoritairement constitué de matière organique et d'éléments, dont on suppose qu'ils découlent d'un apport atmosphérique. Au plan théorique, une sortie de constituants hors de la plante peut être envisagée : on connaît des sorties de liquide de guttation (Heller *et al.*, 2004), la volatilisation de composés organiques foliaires (Niinemets *et al.*, 2004) et, chez certaines espèces, une possible émission d'éléments fertilisants qui seraient propices au développement des lichens corticoles (Hauck *et al.*, 2001 et 2009). Ces événements s'expliquent par l'existence d'un continuum entre l'apoplaste interne (vaisseaux du xylème), espaces intercellulaires et, finalement, fissures subériennes ou lenticelles. Une perte élémentaire par cette voie pourrait se produire et serait liée à une transpiration transcorticale. Nous avons évalué la réalité de ce phénomène et mesuré son intensité en conditions contrôlées (**Tableau 4.9**).

Tableau 4.9 : Valeurs moyennes (\pm E.T, n=3) de transpiration ($\text{ml.dm}^{-2}.\text{j}^{-1}$) trans-subériennes et foliaires mesurées à l'aide de potomètres sur des rameaux de frênes de 4 ans.

Série de mesures	Suber	Feuilles
1	$1,21 \pm 0,67$	$0,57 \pm 0,01$
2	$0,37 \pm 0,05$	N.M
3	$0,26 \pm 0,03$	N.M
4	$0,40 \pm 0,01$	$0,59 \pm 0,01$
5	$0,42 \pm 0,18$	$0,57 \pm 0,11$
6	$0,40 \pm 0,07$	$0,47 \pm 0,12$
Moyenne	0,51	0,55
Ecart-type	0,35	0,05

N.M : Non Mesurée

Connaissant une formule moyenne de concentration de la sève brute, on peut établir un ordre de grandeur de l'apport transpiratoire, qui porte surtout sur Ca et K. Les études en PIXE et en SEM-EDX montrent un effet des accumulations de ces éléments au niveau des lenticelles (Ca, K) et de la couche externe de l'écorce (K) (**Figures 4.7 et 4.8**).

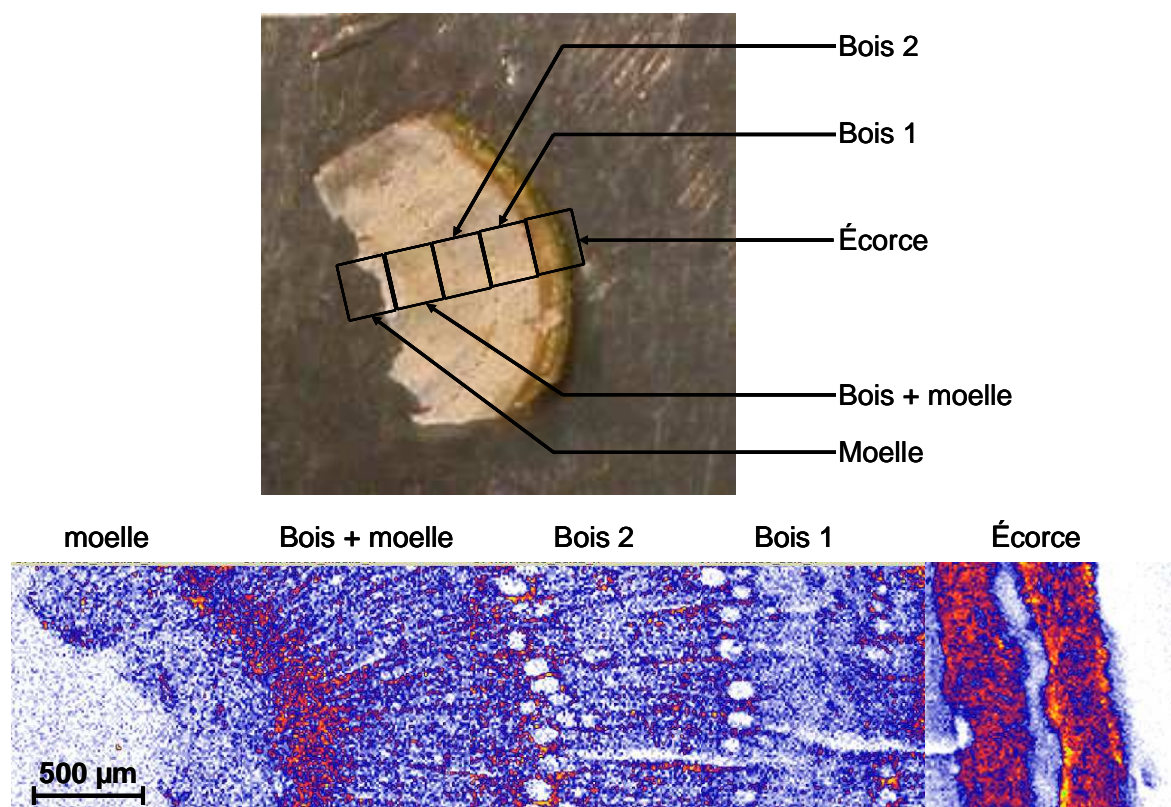


Figure 4.7 : Analyse PIXE de la répartition du potassium dans les différents tissus d'une coupe transversale de tige de frêne de 4 ans.

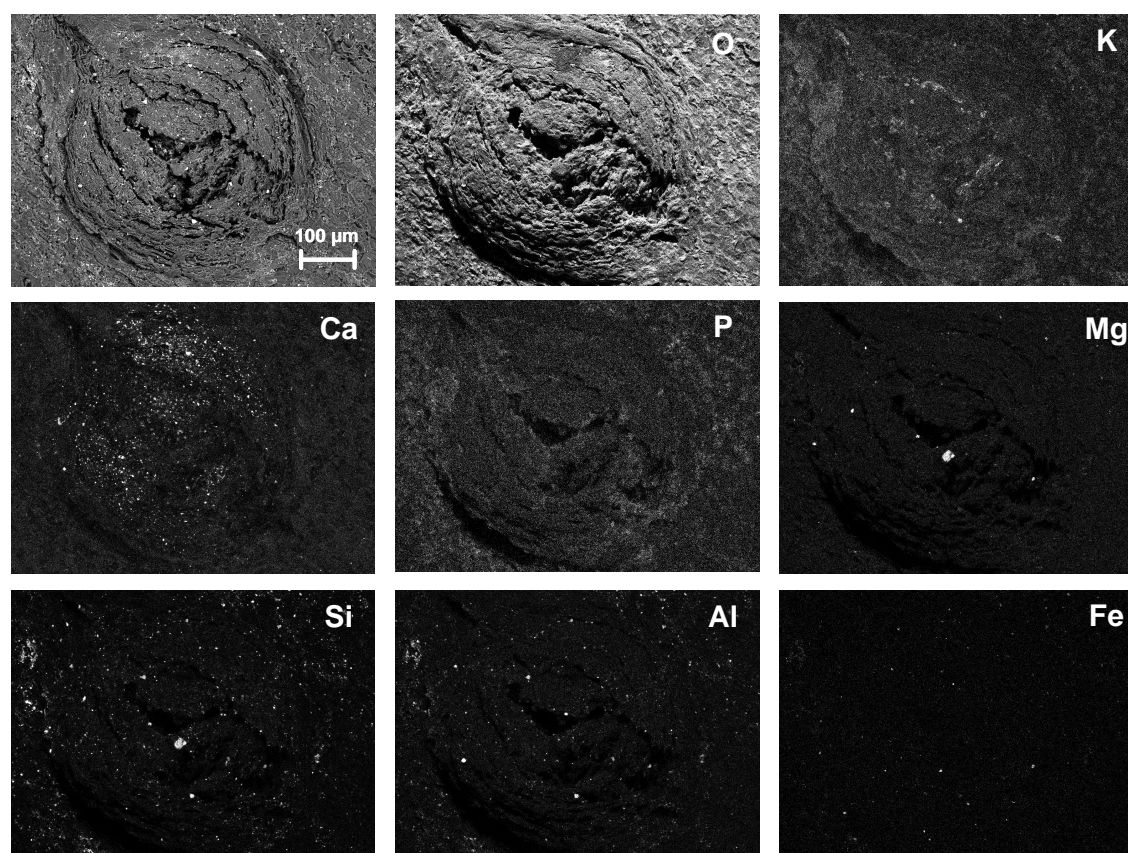


Figure 4.8 : Identification par SEM-EDX de la distribution de 8 éléments (O, K, Ca, P, Mg, Si, Al et Fe) à la surface d'une lenticelle sur une tige de frêne de 4 ans.

IV.3.1.7. L'enlèvement du dépôt par la pluie

IV.3.1.7.1. Etude de la capacité d'enlèvement du dépôt par la pluie sur l'écorce de frêne

L'eau de pluie ruisselant sur l'écorce de frênes âgés de 9 ans a été obtenue à l'aide d'un montage fixé sur les arbres (voir matériel et méthodes). On appelle, ici, l'eau de ruissellement, le lessivat qui, une fois concentré par évaporateur rotatif, donne le concentrat.

IV.3.1.7.2. Comparaison du lessivage par la pluie avec un lessivage artificiel

Deux frênes âgés de 9 ans (nommés frêne A et B) ont été lavés entièrement (du tronc jusqu'aux rameaux de 1 an tous âges confondus). La surface de suber totale de chaque arbre et la masse totale de dépôt libre présente sur ces arbres sont ainsi mesurées : l'arbre A a une surface de 171,1 dm² sur laquelle 2849 mg ont été enlevés par un lavage au pinceau (soit 16,7 mg/dm²). 2511 mg ont été enlevés à l'arbre B sur une surface de 172,9 dm² (soit 14,5 mg/dm²). Les résultats de l'expérience sur le lessivage des troncs de frêne par l'eau de pluie nous permettent de comparer la masse de dépôt libre enlevée sur la totalité de l'arbre à un instant "t" (par un lavage au pinceau) et la masse de dépôt libre enlevée par la pluie sur une longue période. Rappelons que l'enlèvement du dépôt par l'eau de pluie a été observé sur un an et demi et sur deux individus. La taille des arbres de notre plantation étant très homogène (les arbres ont tous le même âge et ont eu une croissance semblable) nous permet d'estimer la surface d'écorce qui a subi un lavage par l'eau de pluie (on prendra les mêmes surfaces que pour les arbres A et B). Les récolteurs d'eau étant placés à 1,5 m du sol, on retranchera 25,5 dm² pour chaque arbre.

Au total, le lavage au pinceau à un instant "t" enlève 5360 mg sur 344 dm² (soit 15,6 mg/dm²) alors que le lessivage par la pluie enlève 20700 mg sur 293 dm² sur un an (soit 70,7 mg/dm²/an) ce qui nous donne, pour le rapport lessivage par la pluie/lavage instantané au pinceau, un facteur 4,5. Ce résultat démontre clairement que des apports atmosphériques nouveaux se produisent constamment et sont quantitativement importants.

En réalité, l'eau de pluie ne lessive pas la totalité de l'écorce mais seulement certaines zones ce qui conduit à une surestimation de la surface d'écorce lavée décrite dans le paragraphe

précédent. On a, en effet, constaté que certaines zones étaient privilégiées et d'autres épargnées par la pluie. Cela varie beaucoup en fonction de différents facteurs comme l'intensité de la pluie, son orientation ainsi que celle de l'arbre et des rameaux, la présence ou l'absence de canopée... Il est ainsi intéressant de tenter d'estimer la projection horizontale de la surface végétale soumise à la pluie pour chaque épisode. Cela a été possible grâce à la connaissance de la surface du seau qui récolte l'eau témoin ($3,14 \text{ dm}^2$). En comparant le volume témoin recueilli et le volume de lessivat, on peut estimer la surface de cette projection (qu'on appellera "surface utile"). Par exemple, avec 1L d'eau recueilli dans le témoin et 5L de lessivat, la surface utile sera de $5 \times 3,14 = 15,7 \text{ dm}^2$.

La surface utile moyenne des épisodes pluvieux sur un an et demi est estimée à $47,2 \pm 20,1 \text{ dm}^2$. Avec 20700 mg de dépôt libre enlevé en un an on obtient 439 mg/dm^2 de surface utile. Cela conforte l'hypothèse d'un renouvellement du dépôt sur les écorces, renouvellement influencé, notamment, par les conditions météorologiques et dont le "turnover" ne paraît pas excéder quelques mois.

IV.3.1.7.3. Recherche des variables explicatives des valeurs du lessivage par la pluie

Le **Tableau 4.10** nous donne les volumes de lessivat récolté (en L) dans les seaux récolteurs, le volume témoin (en mL), la masse de dépôt enlevée à la matrice écorce (en g) et une estimation de la "surface utile".

L'enlèvement du dépôt par la pluie est un processus important dans l'étude du dépôt de surface sur les écorces. Il joue, en effet, un rôle majeur dans le renouvellement du dépôt mais est aussi très complexe car influencé par différents facteurs : la quantité de pluie reçue par l'arbre, le temps qui sépare deux épisodes de pluie, la durée et l'intensité de la pluie, la présence ou l'absence de canopée (qui apparaît au début du mois de mai chez le frêne), l'intensité du dépôt sec (dry deposit) et du dépôt humide (wet deposit) entre deux épisodes pluvieux...

Nous ne contrôlons évidemment pas tous ces facteurs mais une partie seulement (comme la quantité d'eau qui a ruisselé sur le tronc ainsi que la durée séparant deux épisodes pluvieux).

Tableau 4.10 : Volumes des lessivats, volumes témoins, masse de dépôt enlevée à l'écorce et "surface utile" par la pluie pour chaque épisode pluvieux sur un an et demi

Date	Volume lessivât (L)	Masse enlevée à la matrice (g)	Volume témoin (mL)	"Surface utile" (dm ²)
31 janvier 2006	0,246	0,04	148	5,2
16 février 2006	9	0,891	NM	NM
19 février 2006	4	0,44	NM	NM
05 mars 2006	10	0,74	NM	NM
08 mars 2006	10	0,38	600	52,3
9-10 mars 2006	1,6	0,13	200	25,1
11 mars 2006	10	0,4	475	66,1
23-24 mars 2006	3,5	0,63	260	42,3
27-28 mars 2006	8	0,58	400	62,8
29-30 mars 2006	7	0,41	400	55,0
31 mars 2006	7	0,24	300	73,3
03 avril 2006	7	0,7	420	52,3
10 avril 2006	10	1,378	700	44,9
08 mai 2006	10	1,625	800	39,3
10 mai 2006	10	0,604	460	68,3
16 juin 2006	0,66	0,168	660	3,14
Jullet-Août 2006	6,5	0,53	560	36,4
15 septembre 2006	4,5	1,038	320	44,2
17 septembre 2006	1,5	0,442	180	26,2
25 septembre 2006	5,5	1,967	400	42,2
01 octobre 2006	7,5	1,089	840	28,0
03 octobre 2006	1	0,183	300	10,5
20 octobre 2006	4	0,801	260	48,3
24 octobre 2006	5	1,025	280	56,1
19 novembre 2006	10	1,641	780	40,3
21 novembre 2006	10	0,755	460	68,3
29 novembre 2006	3	0,478	140	67,3
04 décembre 2006	2	0,421	180	34,9
06 décembre 2006	10	0,607	800	39,3
08 décembre 2006	10	0,39	900	34,9
Début Jan 2007	10	0,868	1500	20,9
8-9 janvier 2007	10	0,455	320	98,1
18 janvier 2007	0,9	0,182	50	56,5
23 janvier 2007	10	0,583	400	78,5
07 février 2007	5	0,411	160	98,2
08 février 2007	1	0,256	140	22,4
10 février 2007	10	0,537	660	47,6
12 février 2007	10	0,289	660	47,6
25 février 2007	10	0,826	740	42,5
26 février 2007	10	0,296	400	78,5
27 février 2007	5	0,146	240	65,4
26 avril 2007	2	3,46	100	62,8
27-29 avril 2007	1,5	0,695	100	47,1
1-2 mai 2007	7	1,348	350	62,8
5-8 mai 2007	10	0,43	900	34,9
14 mai 2007	10	0,577	880	35,7
17 mai 2007	10	0,335	800	39,3
26-27 mai 2007	10	0,662	740	42,5
28-29 mai 2007	10	0,34	550	57,1
31 mai 2007	10	0,242	700	44,9
01 juin 2007	4	0,159	200	62,8
04 juin 2007	5	0,176	580	27,1
06 juin 2007	4	0,166	800	15,7
07 juin 2007	5	0,223	600	26,2
15 juin 2007	10	0,282	1100	28,6

NM : Non Mesuré

On se demande alors quels facteurs influencent le plus les processus d'enlèvement par la pluie du dépôt sur les troncs de frêne. Nous tentons de répondre à cette question en testant les corrélations entre les différents facteurs.

D'abord, une régression linéaire simple entre le nombre de jours qui séparent deux épisodes de pluie et la masse enlevée à la matrice écorce nous donne une valeur de p égale à $2,543.10^{-3}$ avec $R^2=0,4589$. La période de temps qui sépare deux épisodes de pluie influence donc significativement la masse de dépôt qui sera enlevée par la pluie. Ce résultat suggère que le dépôt libre présent sur l'écorce s'accumule en fonction du temps mais ne nous permet pas de dire si cette accumulation est régulière ou non ou s'il existe un seuil de cumul sur l'écorce.

Si l'on teste (toujours par régression linéaire simple) le volume de lessivat récolté et la masse enlevée à la matrice, la p -value obtenue est de 0,7343 avec $R^2=0,002278$. Ici, le volume de lessivat qui ruisselle sur le tronc n'est pas corrélé avec la masse de dépôt entraîné. Cela peut s'expliquer par un volume limite pour lequel il ne reste plus de dépôt enlevable par l'eau de pluie. Une explication pourrait être que l'intensité et l'inclinaison de la pluie confèrent moins d'importance au volume de pluie qui lessive le tronc. Un orage violent avec des bourrasques de vent aurait, pensons-nous, plus d'effet sur le lessivage du dépôt qu'une pluie régulière et verticale.

Pour coupler deux facteurs, nous devons réaliser une régression linéaire multiple. La variable à expliquer correspond à la masse de dépôt enlevée par la pluie. En prenant la période de temps entre deux épisodes de pluie et le volume de lessivat comme variables explicatives, on trouve les résultats suivants : un effet significatif de la période de temps entre deux épisodes de pluie (p -value= $8,29.10^{-5}$) ; un effet non significatif du volume de lessivat récolté (p -value=0,251), les deux facteurs cumulés ne présentent pas de corrélation avec la masse de dépôt enlevée (p -value=0,978).

Cependant, le modèle est sans doute loin d'être aussi simple et d'autres facteurs jouent probablement un rôle dont l'importance reste à déterminer.

IV.3.1.8. Êtres vivants identifiés dans le dépôt de surface

Comme le résume le schéma de la **Figure 4.9**, le dépôt à la surface des arbres apparaît comme un ensemble de très grande complexité, majoritairement constitué de matière organique (généralement les $4/5^{\text{ème}}$ de la masse).

Une part de ce dépôt provient des constituants du sol (composés géogéniques), apportés par l'atmosphère, de l'environnement immédiat pour une part (du fait de phénomènes

météorologique ou de pratiques agricoles, labours, semis, par exemple) ou de zones plus ou moins éloignées (poussières désertiques apportées en régime de foehn). Une part provient des activités biologiques de l'écosystème environnant (composés biogéniques) : apports issus du tronc lui-même, restes végétaux et animaux plus ou moins pulvérisés parmi lesquels les débris de feuilles mortes peuvent constituer une part importante. Enfin, une fraction biologique vivante existe dans ce dépôt et présente des êtres microscopiques photosynthétiques (par exemple : *Pleurococcus sp.*) et d'autres qui sont saprophytes (bactéries et champignons) (**Figure 3.4**). A cet ensemble, d'origine naturelle, s'ajoute une part issue de l'activité humaine (composés anthropogéniques) qui peut jouer un rôle clairement qualitatif en apportant des composés spécifiques (par exemple : plomb tétraéthyle, HAP, PCB, pesticides...) ou un rôle quantitatif en étant responsable de la délocalisation en masse de composés initialement biologiques ou géogéniques (émission de poussières de mines, d'hydrocarbures pétroliers, d'amiante...).

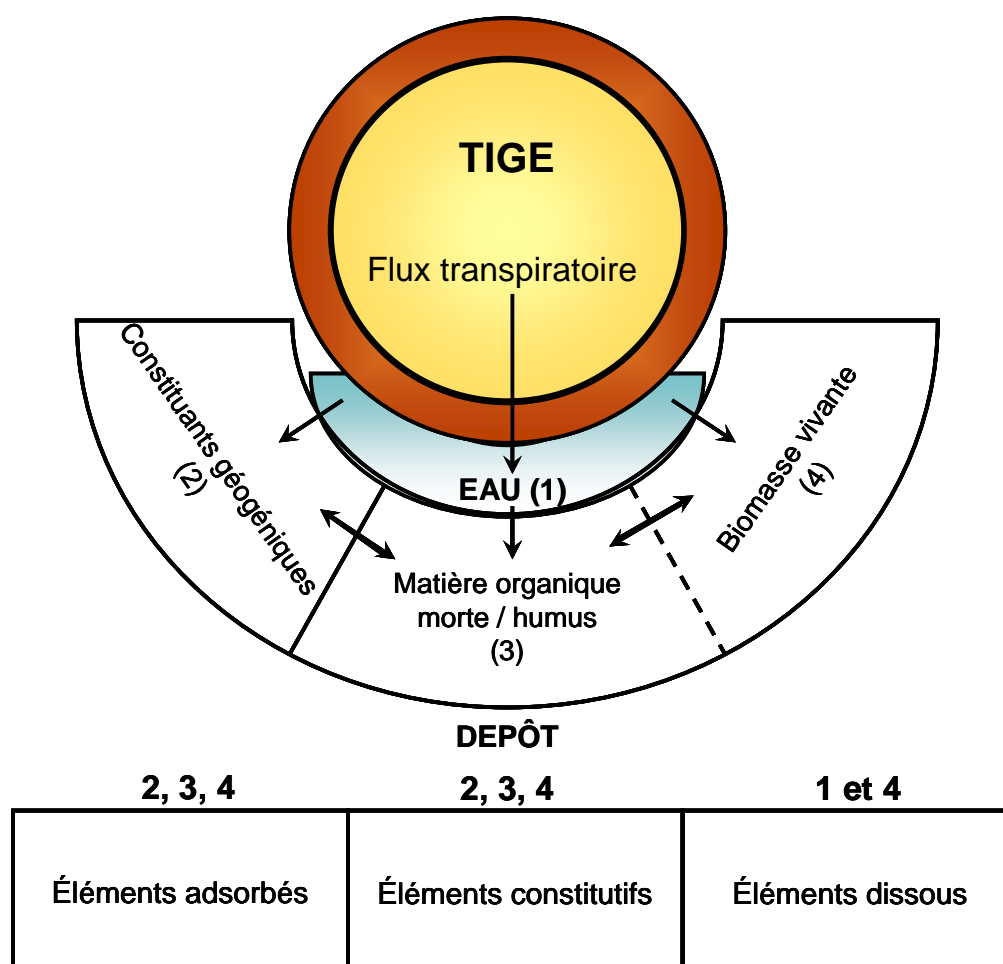


Figure 4.9 : Composition du dépôt de surface sur les écorces d'arbres et fonctionnement de cet écosystème.

Ce dépôt, dans son ensemble, rassemble les caractéristiques physico-chimiques d'un biotope fonctionnel (température, lumière, eau, composés organiques et minéraux, matrice adsorbante argilo-humique) qui permet l'implantation d'une biocenose particulière avec un maillon photosynthétique, surtout représenté par les algues unicellulaires de type *Pleurococcus sp.*, ou par des cyanobactéries, et avec un maillon hétérotrophe vis-à-vis du carbone rassemblant sans nul doute tous les types microbiens capables d'assurer la minéralisation de la matière organique. En outre, nous avons démontré qu'un flux transpiratoire dépose les constituants de la sève brute à ce niveau (**Figure 4.9**). Dire que cet ensemble présent à la surface des écorces est un "dépôt libre" constitue une erreur : c'est un ensemble compartimenté, complexe, évolutif, qui mérite sans nul doute le nom d'"écosystème". Il possède deux particularités fortes : 1) l'essentiel de ses constituants est apporté par l'atmosphère ; 2) c'est un système dont l'activité biologique est strictement contrôlée par les apports d'eau (vapeur d'eau atmosphérique et pluie). C'est donc un système qui a sélectionné des êtres reviviscents dont les lichens sont une image familière. Au cours du temps, ce système passe par des phases très contrastées : des phases de sécheresse à activité biologique réduite pendant lesquelles le dépôt peut augmenter par apport atmosphérique, des phases d'intense activité biologique où croissance de la biomasse et transformations microbiologiques redistribuent les constituants dans cet ensemble, des phases d'appauvrissement de la masse par lessivage pluvial. Dans ce contexte, il est évident que la distribution spatiale du dépôt sur toutes les parties d'un tronc d'arbre est très hétérogène : on se souvient de cette méthode militaire d'orientation où le nord est repéré grâce à la présence des algues et des mousses sur cette face des troncs la plus humide, en général en face nord.

On en conclut qu'un échantillonnage méticuleux est nécessaire pour une mesure de composition ayant du sens et que les prélèvements doivent impliquer une surface importante. L'état de la surface à une échelle fine (lenticelles, cicatrices de rameaux, craquelures...) semble permettre des rétentions importantes, localisées. Comment cet ensemble peut-il enregistrer sur des pas de temps longs des apports élémentaires anthropiques ? Par quelle méthode peut-on accéder à une mesure précise de ces événements ? Comment cet ensemble peut-il fournir aux tissus du tronc les éléments étudiés ? Ces questions seront abordées dans les chapitres suivants. D'un point de vue physico-chimique, cinq compartiments vont être capables d'interagir pour déterminer des flux d'échange (**Figure 4.10**).

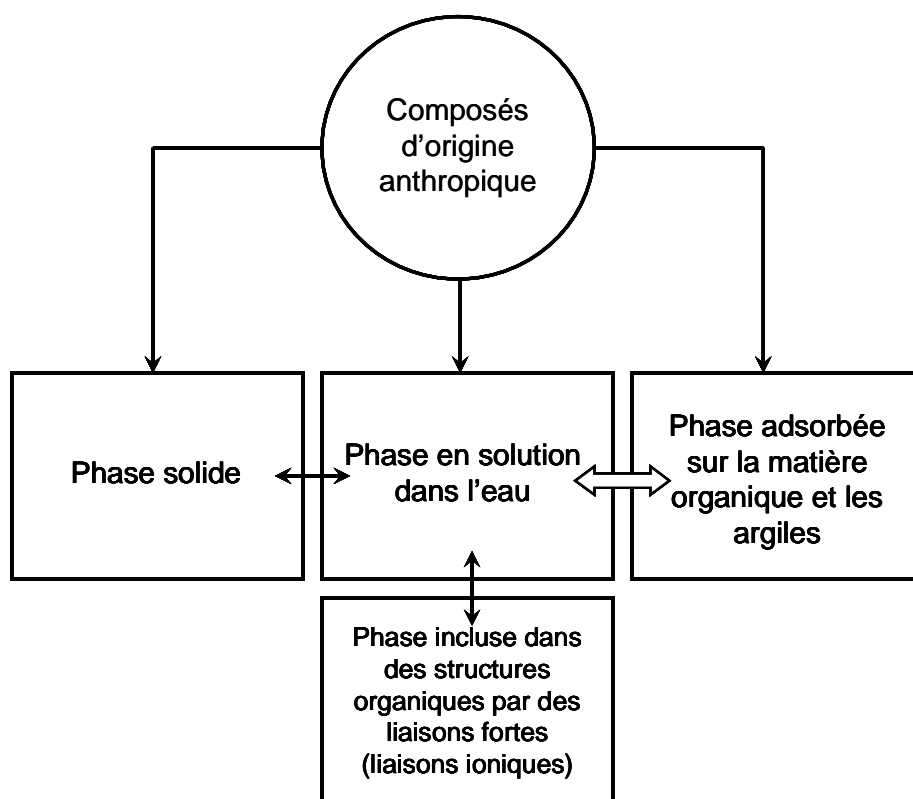


Figure 4.10 : Schématisation des échanges entre les 5 compartiments mis en jeu dans le cas d'un apport superficiel sur un tronc d'arbre.

IV.3.1.9. Schéma résumant les caractéristiques des dépôts de surface

La **Figure 4.11** tente de schématiser le fonctionnement global de cet écosystème. À côté d'une phase solide (non représentée dans ce schéma) les éléments peuvent être à l'état dissous dans tous les compartiments, une part dispersée très importante peut être adsorbée sur les argiles ou sur la matière organique. Un ensemble d'éléments constitutifs va caractériser soit les matrices géogéniques, soit les matrices biologiques, vivantes ou mortes. Tous ces compartiments interagissent et peuvent générer une fraction intégrable dans la tige, par un processus qui implique sans nul doute la présence de l'eau et qui doit donc être discontinu.

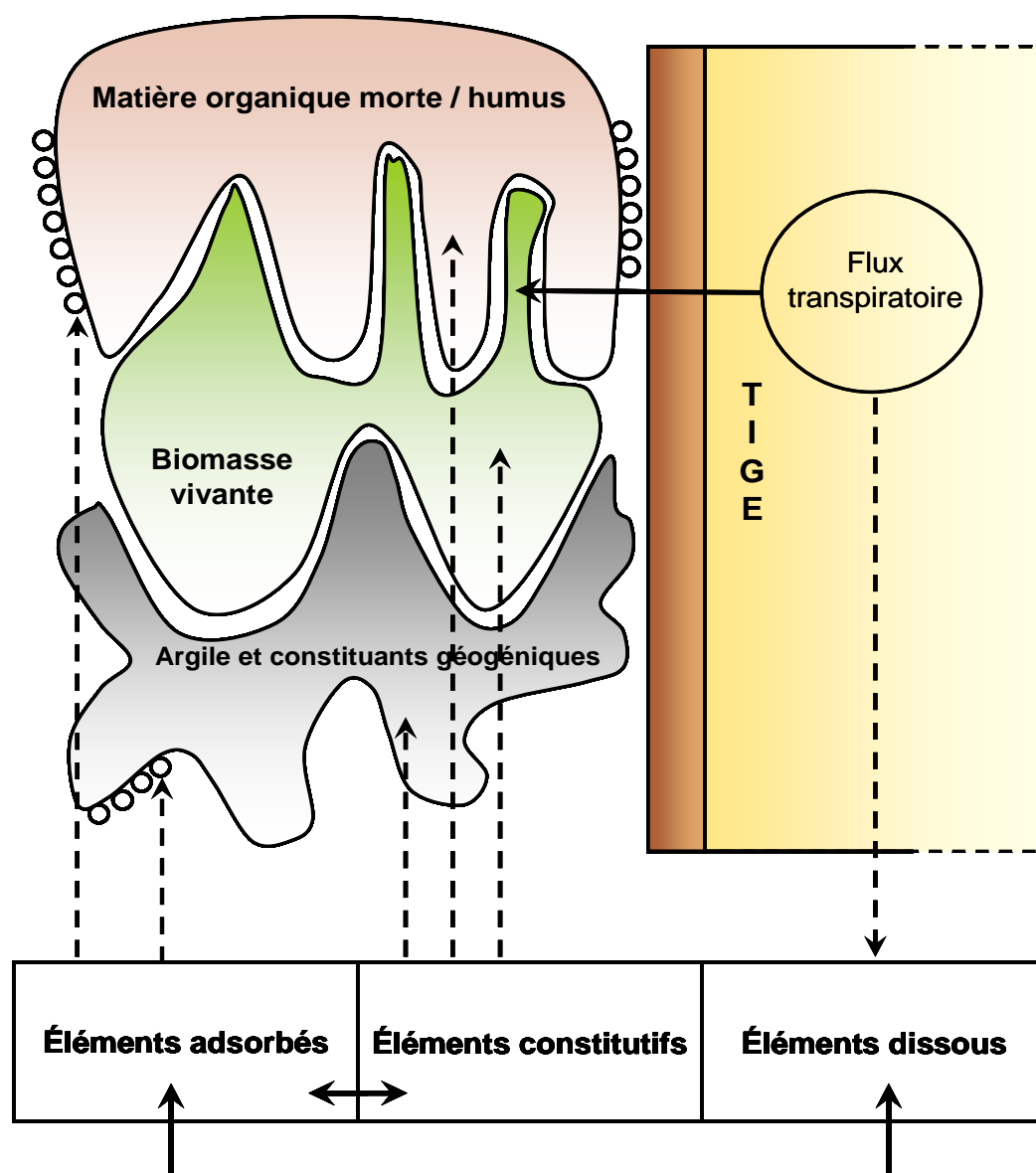


Figure 4.11 : Schéma résumant les caractéristiques des dépôts de surface.

Chapitre V

Intégration des constituants atmosphériques à l'intérieur des tiges et des troncs

Sommaire

V.1. Généralités	116
V.2. Mise au point d'un fractionnement tissulaire	119
V.3. Distribution des éléments dans une tige de frêne de 4 ans	125
V.4. Recherche d'un profil élémentaire pour le frêne, en absence d'apport polluant atmosphérique	134
V.5. Discussion	137

V.1. Généralités

Nous avons vu dans le chapitre IV que le dépôt atmosphérique sur les tiges et troncs d'arbres était le résultat d'un processus très complexe qui aboutissait à la constitution d'un écosystème de surface, reviviscent et de durée variable, en fonction du potentiel d'enlèvement par les intempéries. Pour que des constituants atmosphériques s'intègrent à l'intérieur des tiges, considérées dans une première étape comme homogènes, plusieurs processus peuvent être supposés intervenir : la **Figure 5.1** les résume.

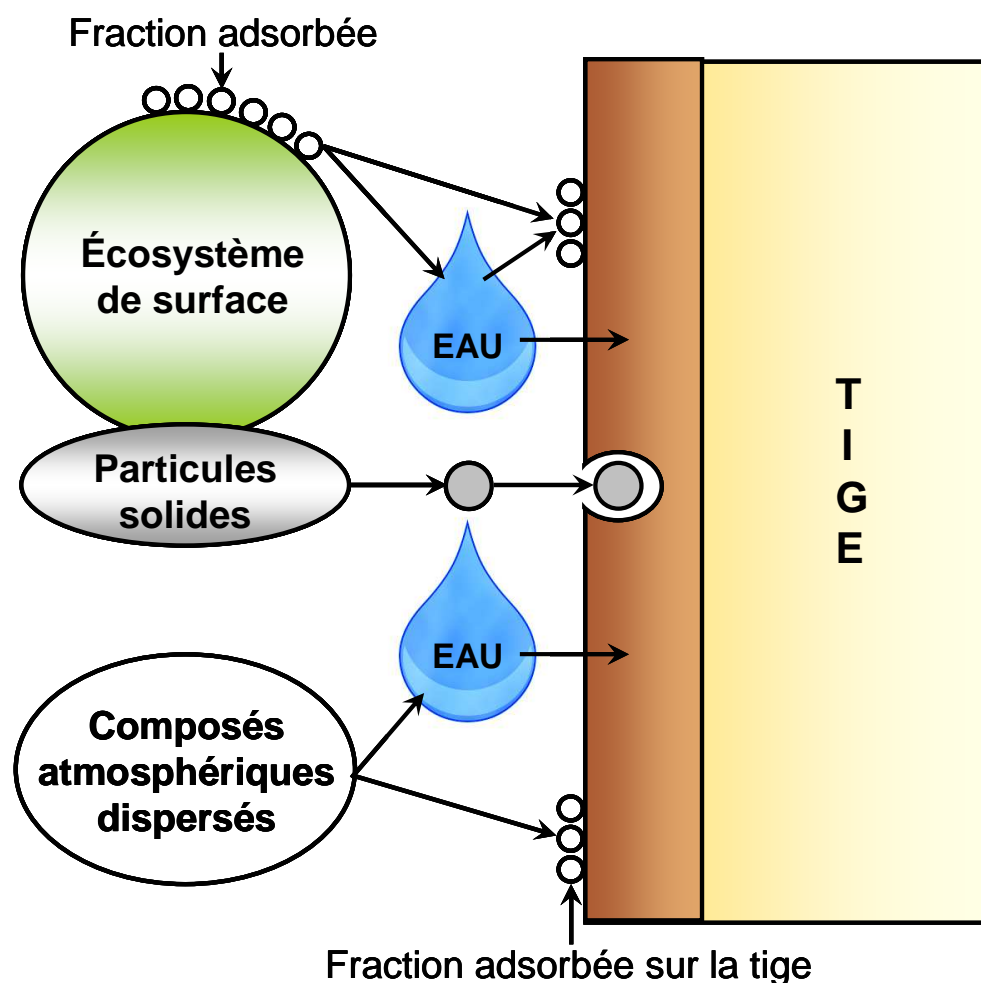


Figure 5.1 : Ensemble des voies hypothétiques de transfert de matière de l'atmosphère vers l'intérieur des tiges.

- La voie la plus simple serait un transfert direct de l'atmosphère vers la tige, comme le fait O_2 , CO_2 ou H_2O avec une éventuelle intervention des lenticelles. Cette voie est celle de composés volatiles.

- La deuxième voie serait celle d'un transfert de l'eau (pluie ou rosée) où des produits peuvent être en solution vraie, vers la tige où ils peuvent diffuser dans l'eau interne ou se partitionner avec différentes matrices adsorbantes (subérine, cellulose, membranes biologiques...) ou encore faire l'objet d'un transfert actif.
- La 3^{ème} voie serait celle d'une intégration en phase solide, différant totalement d'un processus de phagocytose mais pouvant résulter de la formation de "micropoches" subériennes au cours de la croissance en diamètre des axes. Par ailleurs, des piègeages lenticellaires sembleraient également possibles.

Nous avons ainsi, au cours de notre travail, tenu compte de ces diverses hypothèses. Cependant, au-delà de cette première étape d'internalisation, est apparue une seconde étape déterminée par le fait que l'intérieur d'une tige ou d'un tronc n'est pas un ensemble homogène mais une succession de tissus différents ayant des fonctions physiologiques différentes et complémentaires. Cette seconde étape s'avérerait ainsi être une étape de distribution entre les différents tissus qui pouvait aboutir à des concentrations des éléments étudiés différant d'un tissu à l'autre, voire même mener par voie physiologique à des hyperaccumulations caractéristiques de tel ou tel tissu.

Enfin, à l'intérieur de la tige, les éléments d'origine atmosphérique confluent avec ceux qui, apportés par la sève brute, sont extraits du sol par les racines.

La **Figure 5.2** tente de donner une image succincte des dynamiques de transfert au sein d'une telle tige.

La base théorique d'une distribution interne découle de la connaissance de deux types d'espaces : le symplasma, constitué par l'ensemble de la matière vivante, au sens strict, c'est-à-dire, séparé de l'environnement par une membrane biologique et assurant son fonctionnement (ADN, enzymes, synthèse protéique et autres...). A l'échelle anatomique, on peut dire qu'il est constitué par l'ensemble des cellules en fonctionnement. Le second espace est appelé apoplaste. Il représente des espaces internes rassemblant les cellules mortes, toutes les parois cellulaires et les espaces intercellulaires. Cet espace n'a pas d'activité physiologique directe (il est le siège d'activités enzymatiques excrétées). Ses caractéristiques physico-chimiques sont indirectement contrôlées par le symplasma, essentiellement par transport de charges et par excrétion de certaines enzymes (par exemple : cellulases).

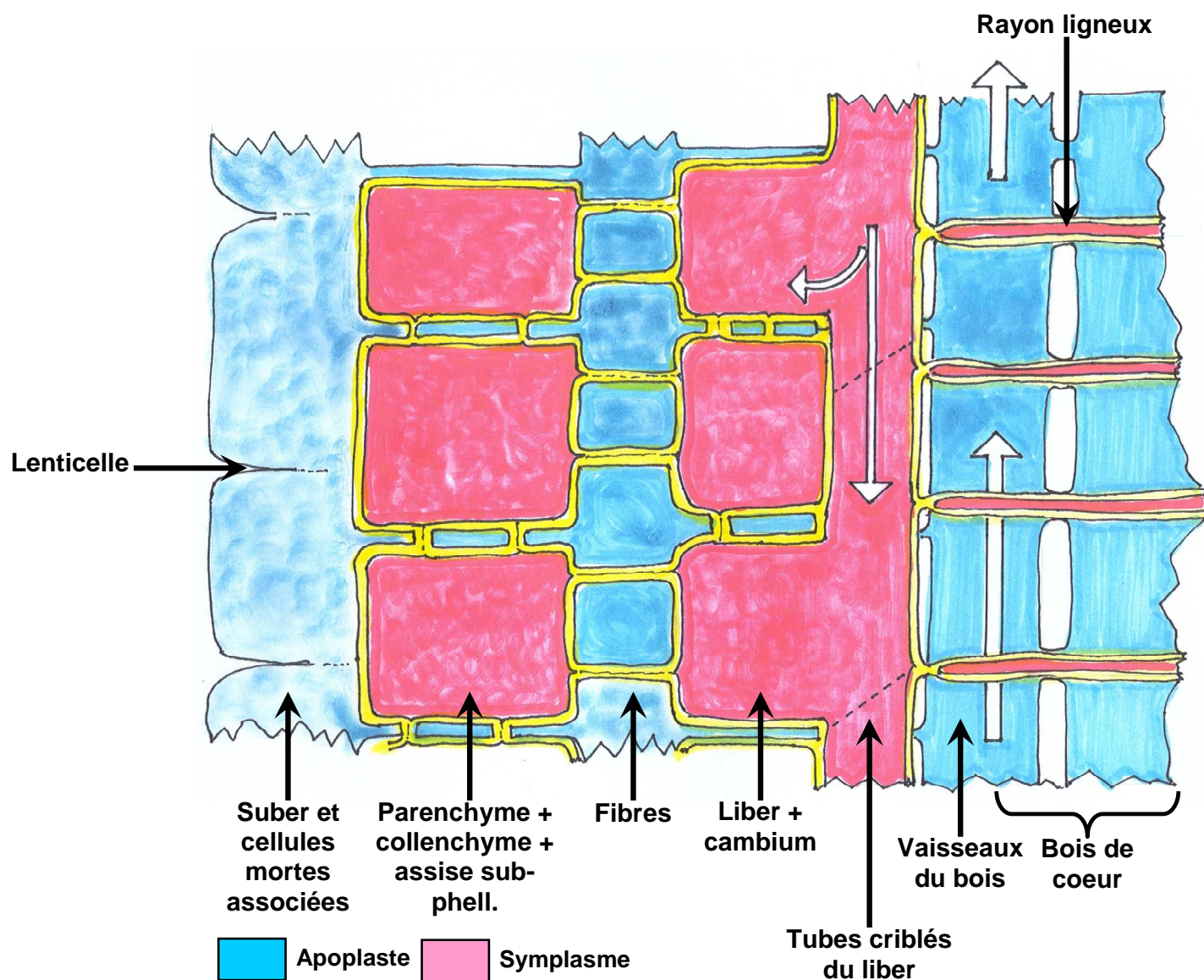


Figure 5.2 : Schéma théorique d'une coupe longitudinale de tige distinguant, à l'échelle anatomique, les espaces symplasmiques et apoplastiques.

Dans l'apoplaste, l'échange des éléments doit théoriquement se conformer aux règles physico-chimiques de la diffusion et de l'équilibre des charges. Notre approche de l'accumulation interne des éléments d'origine atmosphérique s'est ainsi fixée un objectif premier : déterminer la concentration de chacun des éléments (majoritairement les métaux lourds) dans chacun des tissus constitutifs des tiges, de manière à observer d'éventuels gradients ou la présence de sites d'accumulation et de tenter de séparer les apports élémentaires atmosphériques des apports xylémiens issus de l'absorption racinaire (**Figure 5.2**). D'une manière très globale, on peut envisager que le processus général de distribution

des éléments dispersés (molécules ou ions) devrait résulter d'une coopération apoplaste/symplasma telle que résumée par la **Figure 5.3**.

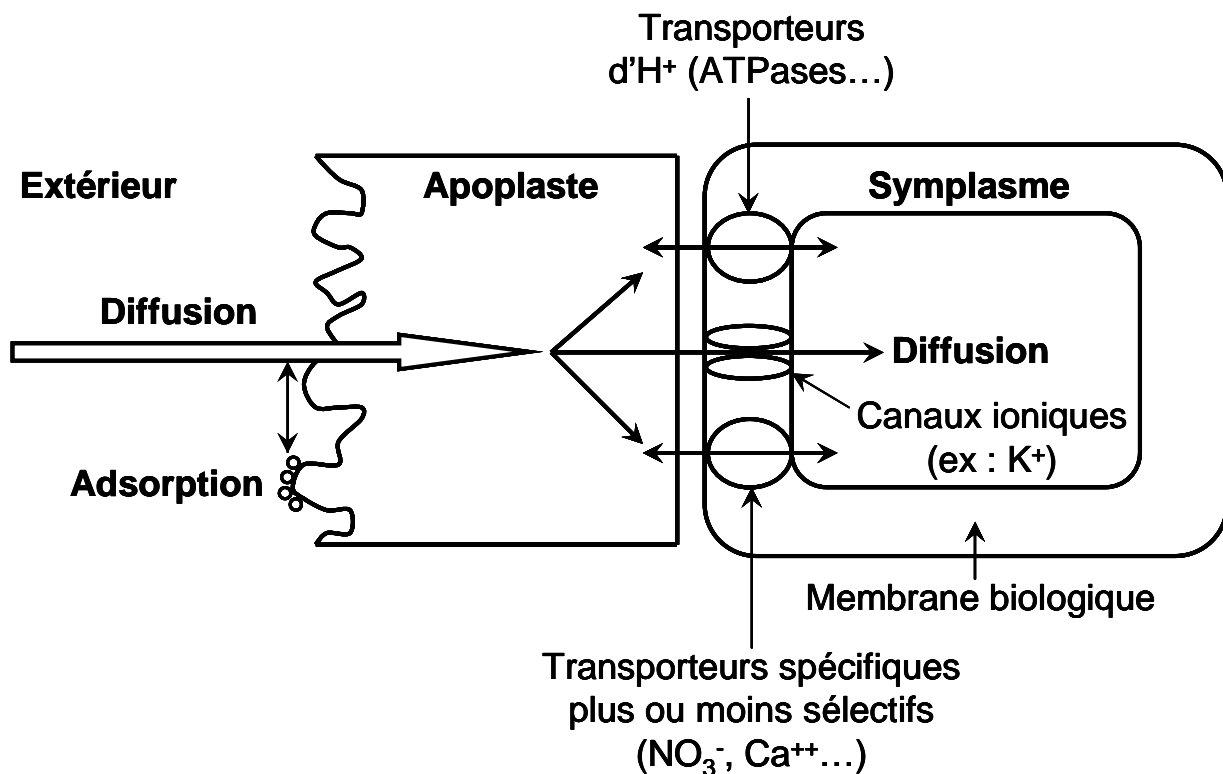


Figure 5.3 : Schéma général de distribution d'éléments dispersés à l'intérieur d'une tige.

Notre objectif d'établir la composition élémentaire de chaque tissu de la tige et d'y mesurer la concentration de chaque élément nécessitait la mise au point d'une méthode de fractionnement suffisamment précis des différents tissus.

V.2. Mise au point d'un fractionnement tissulaire

Ce fractionnement a été obtenu par une technique originale d'abrasion sous loupe binoculaire, où les déterminants de la séparation des tissus étaient : 1) la couleur 2) la résistance mécanique. Le suber est brun clair ; le parenchyme photosynthétique sous-jacent est vert ; les autres tissus sont blanchâtres. Le xylème, les fibres et le bois sont des tissus rigides lignifiés à grande résistance mécanique ; le suber, très résistant à la déchirure, est souple. Les tissus les plus fragiles sont les assises génératrices où se produit la rupture au cours de l'abrasion.

V.2.1. Description de la méthode

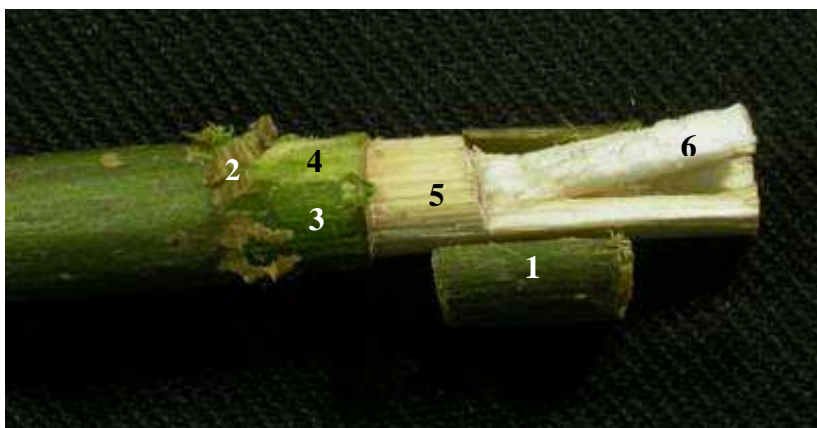
La méthode décrite dans le chapitre III est surtout mise en œuvre sur des tiges de 4 ans. La **Figure 5.4** illustre les résultats obtenus sur des tiges de 1 an (photo du haut) où la moelle (6) est vivante et a une grande importance quantitative. Sur des tiges de 4 ans (photos centrale et du bas), la moelle est morte et a régressé. L'épaisseur du suber n'est pas sensiblement différente de celle d'une tige de un an.

La séparation suber/parenchyme primaire chlorophyllien se voit clairement sur la photo grâce aux couleurs différentes de chaque tissu.

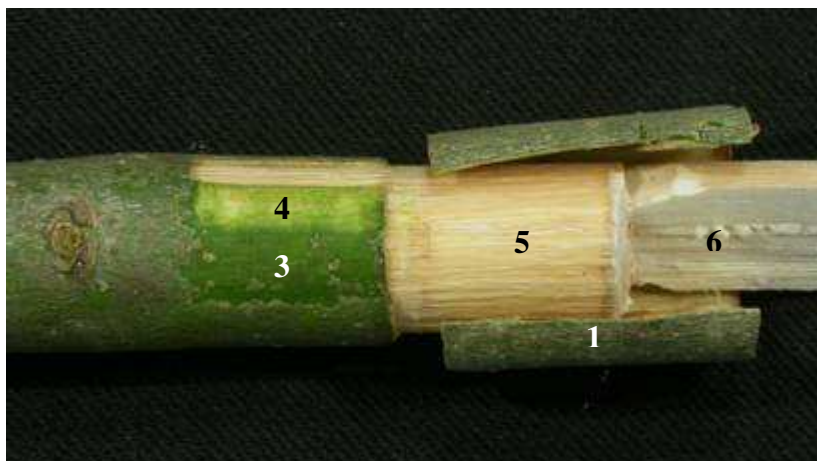
La **Figure 5.5** montre dans une coupe transversale de bois, la succession des cernes avec une alternance bois de printemps / bois d'été facilement visible dans une tige de 4 ans. Un fractionnement au sein du bois par enlèvement de couches successives permet d'évaluer les variations de concentration des éléments d'une couche à l'autre. Le fait que le bois est un ensemble qui reste très hydraté (ce qui est spécialement vrai pour les parenchymes ligneux et les vaisseaux fonctionnels) amène à supposer que les éléments les plus solubles peuvent diffuser et se distribuer de manière assez homogène au sein de ce tissu après quelques mois.

La stratégie détaillée de fractionnement que nous avons choisie sur les tiges de 4 ans est représentée par la **Figure 5.6** et l'aspect microscopique des tissus obtenus est visible sur la **Figure 5.7**. De la sorte, 11 fractions différentes ont été obtenues et soumises à l'analyse.

Tige de 1 an



Tige de 4 ans



Fractionnement du suber

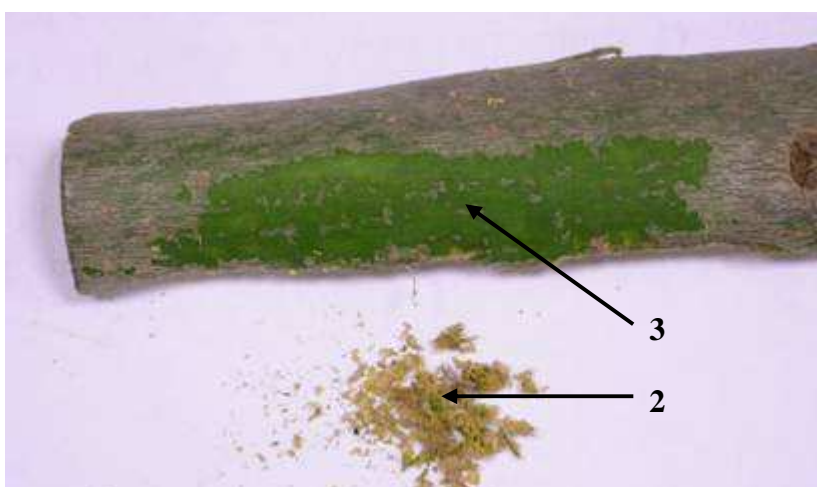


Figure 5.4 : Base anatomique du fractionnement mécanique d'une tige chez *Fraxinus excelsior*
L. 1 : Ecorce ; 2 : Suber ; 3 : Parenchyme vert ; 4 : Collenchyme ; 5 : Bois ; 6 : Moelle.

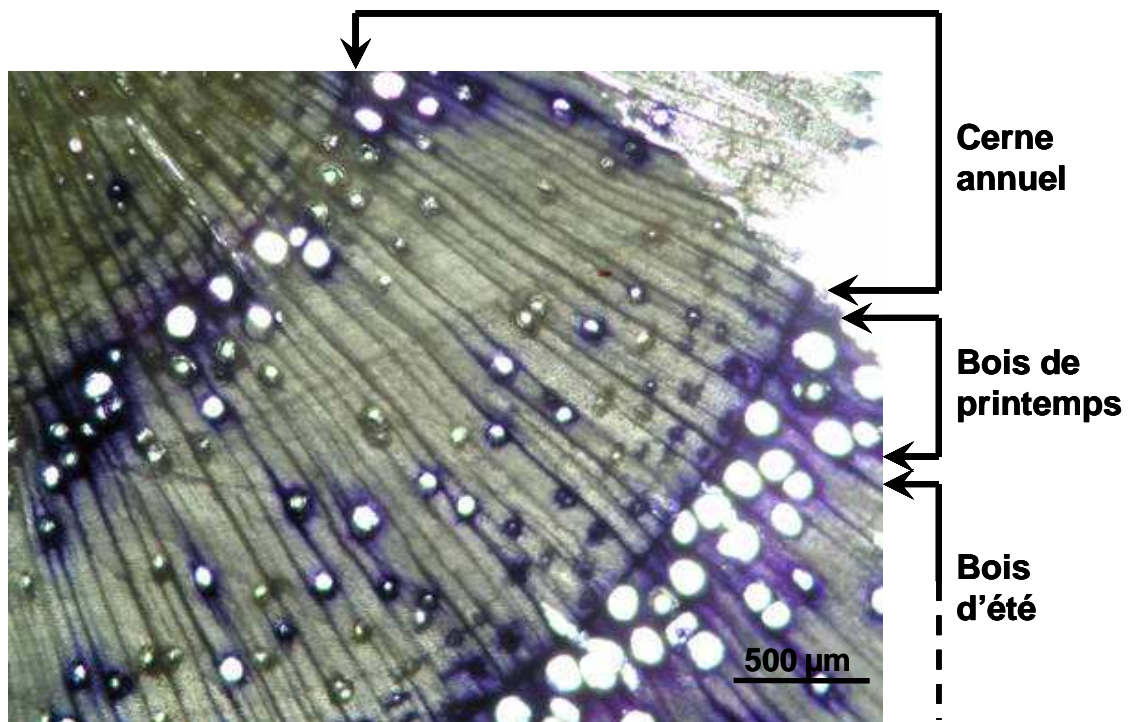


Figure 5.5 : Photo d'une coupe transversale d'une tige de frêne de 4 ans au niveau du bois après le passage d'un colorant hydrosoluble.

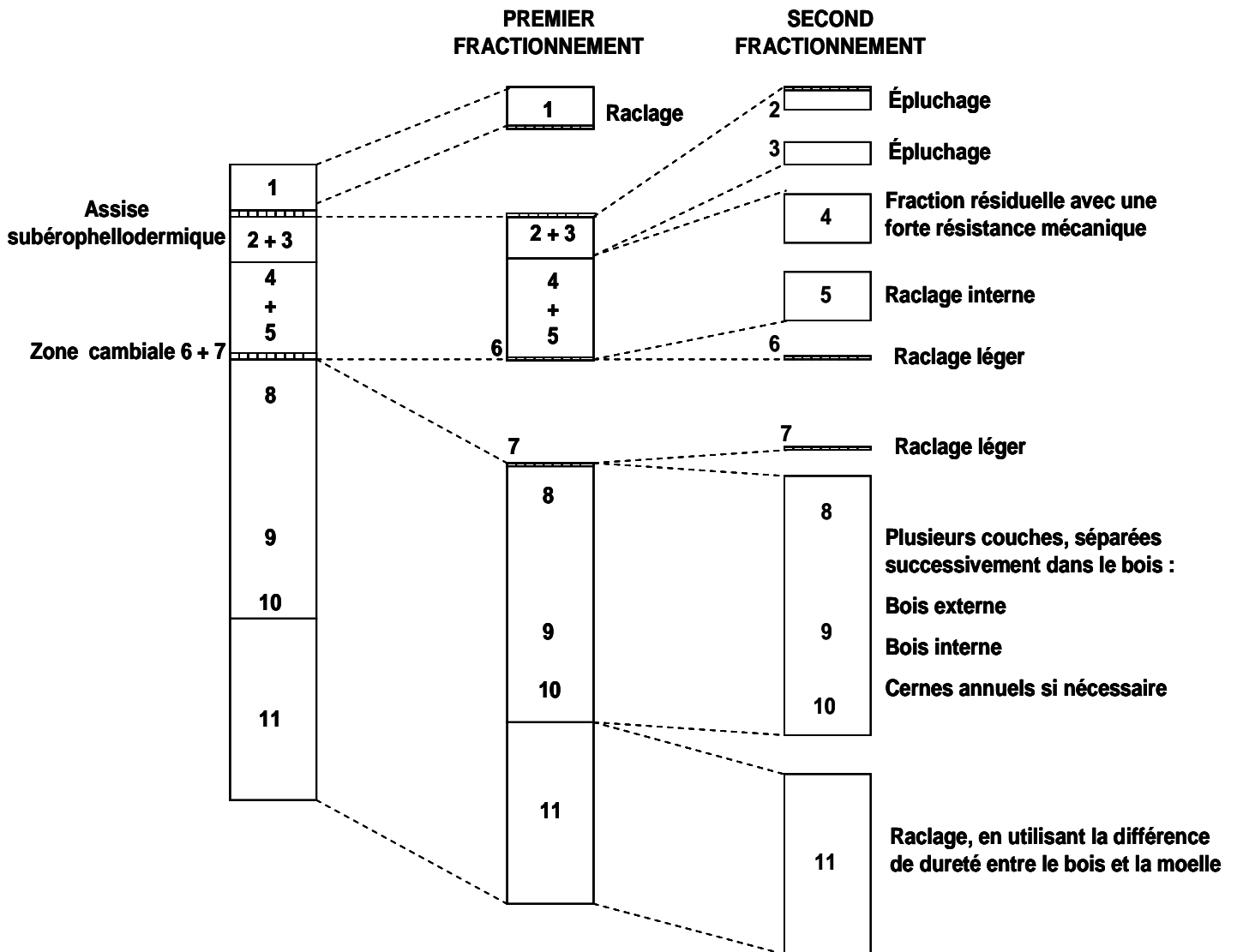


Figure 5.6 : Schéma illustrant la séparation des différentes couches de tissus de tige de frêne de 4 ans. 1 : Suber ; 2 : Parenchyme ; 3 : Collenchyme ; 4 : Fibres (+ Collenchyme) ; 5 : Phloème (+ Fibres) ; 6 : Zone cambiale (+ Phloème) ; 7 : Zone cambiale (+ Xylème) ; 8 : Bois externe ; 9 : Bois interne ; 10 : Xylème I ; 11 : Moelle.

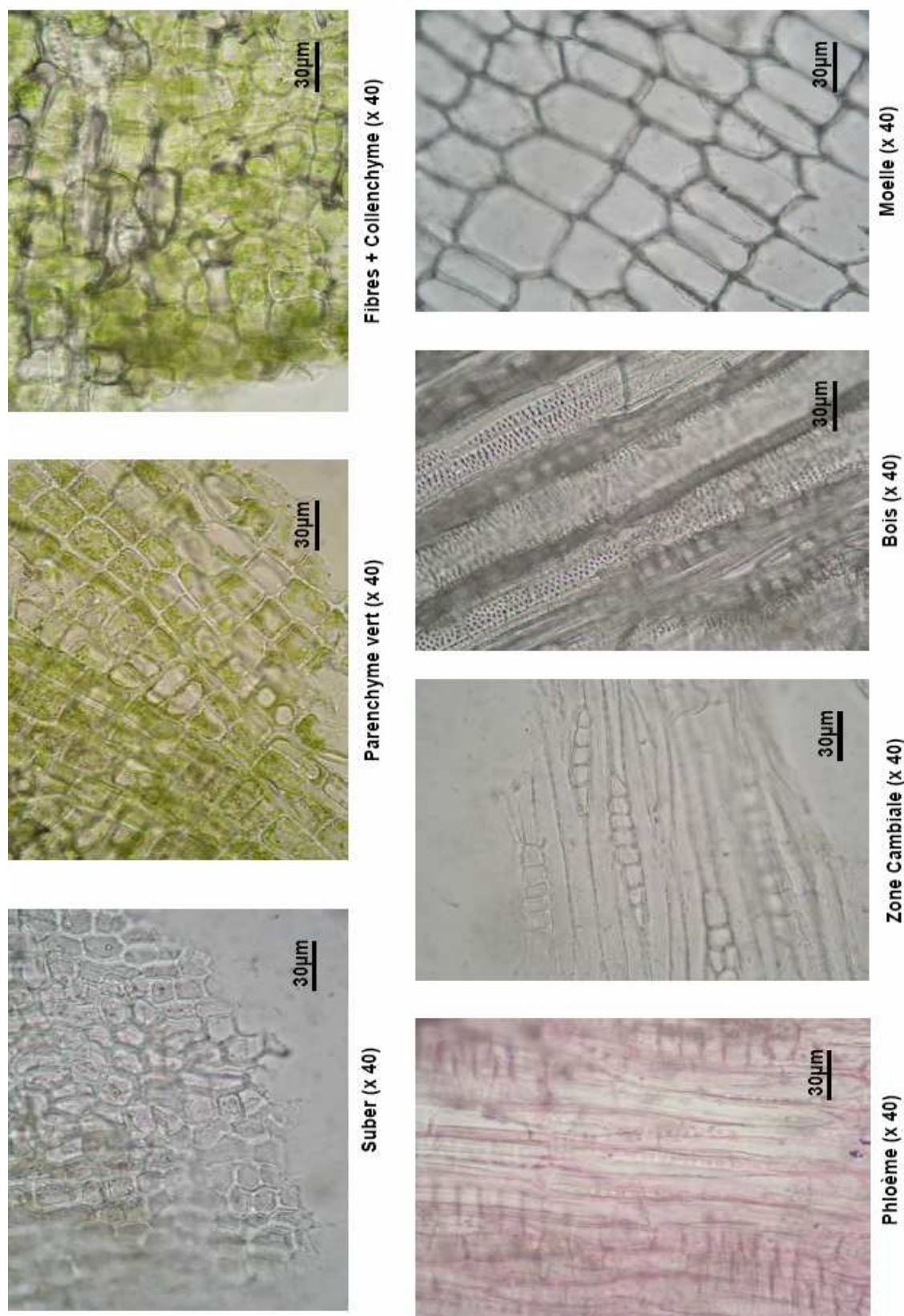


Figure 5.7 : Observation microscopique des différents tissus issus du fractionnement mécanique d'une tige de *Fraxinus excelsior* L. Observation directe : Suber, Phloème, Zone cambiale. Coupe longitudinale dans la fraction échantillonnée : Parenchyme, Collenchyme, Bois, Moelle.

V.3. Distribution des éléments dans une tige de frêne de 4 ans

V.3.1. Visualisation des éléments majeurs par la méthode PIXE sur une coupe transversale de tige de 4 ans

La méthode PIXE permet des détections à une échelle très fine, de l'ordre du micron, d'éléments en très fortes concentrations (100 à 1000 $\mu\text{g.g}^{-1}$). Elle nous a permis, sur des coupes transversales de tige, de visualiser *in situ* clairement la distribution de 3 éléments majeurs, Ca, K et Fe, de comprendre l'importance de l'activité de chaque type de tissus dans la distribution élémentaire et de percevoir l'existence d'une accumulation subérienne très associée à l'apport atmosphérique (**Figure 5.8**).

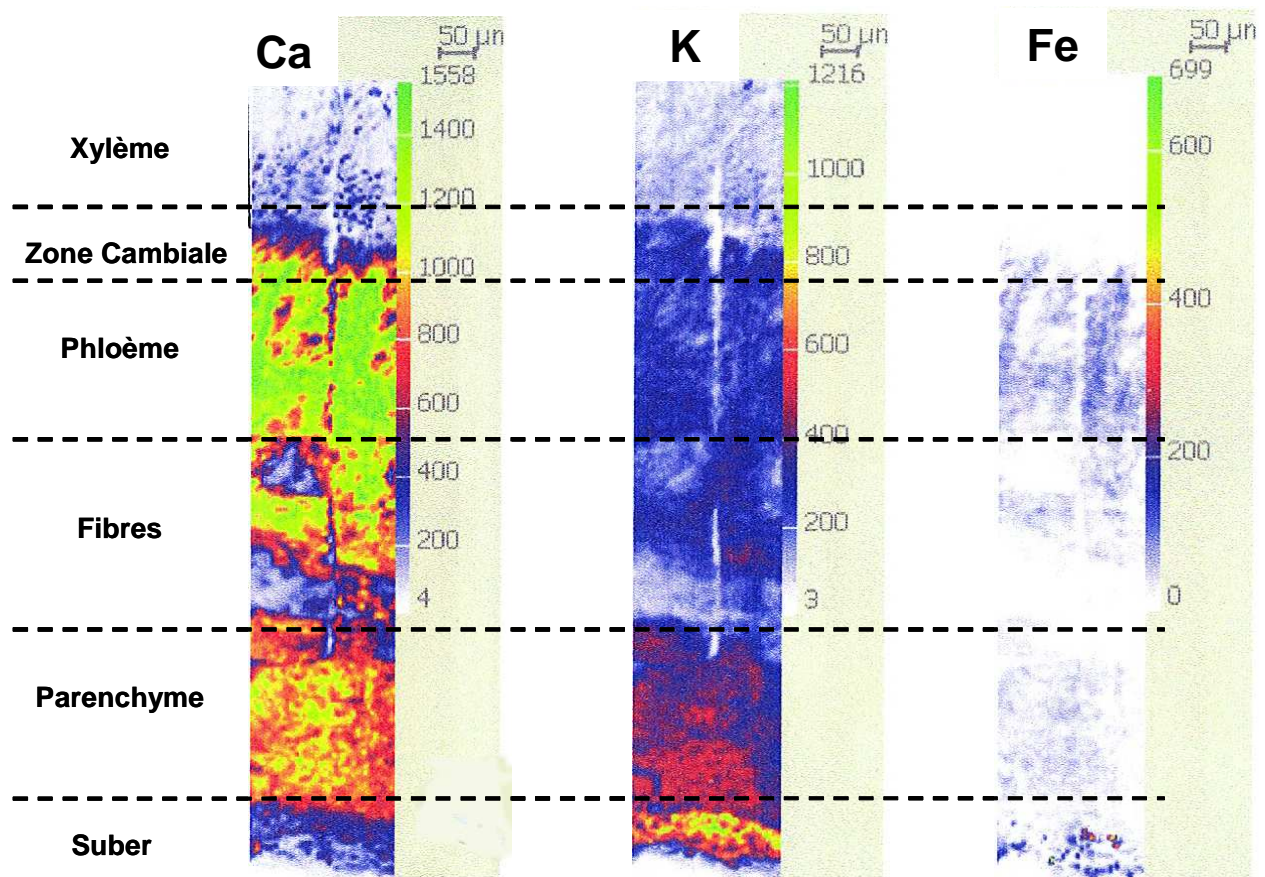


Figure 5.8 : Analyse PIXE sur une coupe transversale d'une tige de *Fraxinus excelsior* L. de 4 ans montrant la distribution de Ca, K et Fe. Les concentrations sont données en unités arbitraires sur le côté droit des images PIXE.

On voit, sur ces coupes, une accumulation interne très forte de Ca, K et Fe, dans les cellules les plus actives (cambium, phloème), qui correspond à des rôles physiologiques de ces

cellules et qui découle très majoritairement d'une fourniture racinaire par la voie du xylème. Les concentrations dans les cellules mortes à parois épaisses (bois, fibres) sont bien plus faibles. On distingue dans les parties superficielles du suber des accumulations élevées, sans rapport avec l'activité physiologique de ce tissu (qui est nulle), qui peuvent résulter d'un apport atmosphérique. Au vu de cette coupe, on sait que la masse des éléments d'origine biologique, fournis par les racines, ne sera jamais négligeable par rapport à la fourniture minérale atmosphérique. On sait également que K et Ca représentent, dans les tiges, une part essentielle du mélange élémentaire présent.

V.3.2. Analyse par ICP-MS des éléments présents dans les différents tissus séparés

Le **Tableau 5.1** montre les caractéristiques des différentes fractions obtenues à partir de la tige de frêne.

Tableau 5.1 : Caractéristiques des différentes fractions isolées à partir d'une tige de frêne de 4 ans (M.S : masse sèche ; M.F : masse fraîche ; C.M : contenu minéral).

Fraction N°	M.S/dm ² (mg)	Contenu hydrique H ₂ O/M.F (%)	C.M/M.S (%)	C/N*	tissu
1	424	29,0	5,7	49 ± 0	Suber
2	717	50,0	5,2	37 ± 0	Parenchyme
3	610	40,0	5,2	44 ± 1,4	Collenchyme
4	1720	46,0	5,0	65 ± 2,8	Fibres (+ Collenchyme)
5	206	57,0	5,2	40 ± 0,7	Phloème (+ Fibres)
6	144	61,2	4,0	36 ± 0	zone cambiale (+ Phloème)
7	80	61,2	4,0	14 ± 0	zone cambiale (+ Xylème)
8	4996	27,5	0,8	182 ± 22,6	Bois externe
9	9110	27,5	0,9	221 ± 14,8	Bois interne
10	457	27,5	0,9	549 ± 127	Xylème I
11	375	19,8	0,9	636 ± 351	Moelle

* n=2

Il y a de très grandes variations du poids sec d'un tissu à l'autre : le bois est le tissu représentant la masse la plus forte et le cambium la plus faible. Dans la partie morte (tissus apoplastiques), l'hydratation est la plus basse : c'est le cas de la moelle, du suber et des fibres. L'hydratation la plus élevée est trouvée, comme prévu, dans le cambium.

La teneur en azote traduit principalement la teneur en protéines des cellules. Elle est très haute (C/N très bas) dans les jeunes cellules en division à parois très minces. C'est le cas du cambium. La teneur en protéines du phloème et du parenchyme est également assez élevée.

Douze éléments ont été identifiés et dosés dans les 12 fractions isolées à partir des tiges de frêne de 4 ans. Ces tissus sont 1) suber, 2) parenchymes, 3) collenchyme,

4) fibres (+ collenchyme), 5) le phloème (+ des fibres), 6) la zone cambiale (+ phloème), 7) la zone cambiale (+ xylème), 8) le bois externe, 9) le bois interne, 10) le xylème primaire, 11) la moelle et 12) la zone cambiale pure (**Figure 5.7**). La **Figure 5.9** montre la concentration de 9 éléments à l'intérieur ces différents tissus.

La **Figure 5.9** fait ainsi apparaître plusieurs points essentiels : dans le symplasme (fractions 2, 3, 5, 6, 7, 12 : parenchyme, collenchyme, phloème, 6, 7, 12 : zone cambiale), les ions physiologiques majeurs (Fe, Zn, Cu) atteignent leur concentration la plus élevée dans la zone cambiale, ce qui veut dire qu'ils sont symplasmiques et en faible concentration dans les parois. La masse des parois atteint sa valeur la plus faible dans la zone cambiale d'où une élévation de la concentration dans cette zone par réduction du dénominateur (masse cytoplasme + paroi) et teneur cytoplasmique maximale liée à une forte activité métabolique. On constate, de manière intéressante, que d'autres ions présentent le même profil : Ni et Cd mais pas Pb, Cr, V et Mn suggérant un rôle physiologique pour Ni et Cd. Dans les autres fractions non cambiales, on peut observer un gradient décroissant de concentration pour tous les éléments, du suber aux tissus internes. Par exemple le rapport suber (fraction 1) sur bois (valeur moyenne pour les fractions 8 + 9) atteint 100 pour V, 53 pour Mn, 33 pour Fe et Pb, 6,5 pour Ni, 6,4 pour Cd, 5,6 pour Zn, 5 pour Cr et 3,3 pour Cu. Ce rapport des concentrations suber/xylème suggère fortement qu'on observe là un gradient issu de l'apport atmosphérique avec une accumulation superficielle et une distribution interne par diffusion qui peuvent parfaitement être exclusivement apoplastiques, avec la mobilité la plus faible pour V, Mn, Pb, Fe se traduisant par le rapport suber/bois le plus élevé.

Dans le cas de certains éléments tels que Fe, Ni, Cu, la concentration atteint une valeur élevée inattendue à l'intérieur de la moelle ou du bois primaire. Ce point nécessite d'autres études pour être compris, mais semble représenter une accumulation relictuelle caractéristique de la moelle de la tige primaire qui est morte et très peu hydratée au stade de l'étude.

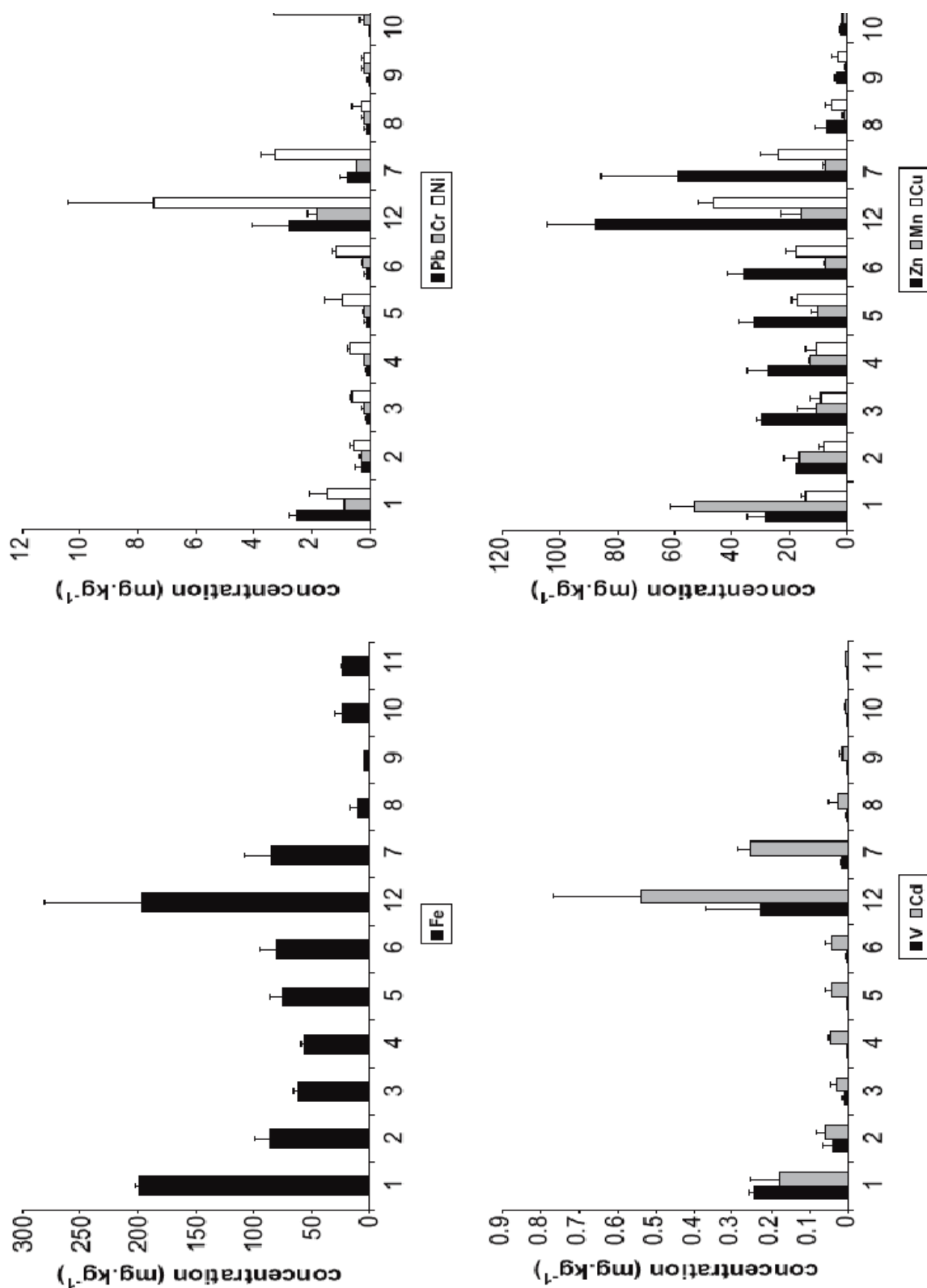


Figure 5.9 : Concentrations de 9 éléments (Fe, Pb, Cr, Ni, V, Cd, Zn, Mn et Cu) dans les différents tissus d'une tige de *Fraxinus excelsior* L de 4 ans. (1) suber, (2) parenchyme, (3) collenchyme, (4) fibres (+ collenchyme), (5) phloème (+ fibres), (6) zone cambiale (+ phloème), (7) zone cambiale (+ xylème), (8) bois externe, (9) bois interne, (10) xylème I, (11) moelle et (12) zone cambiale pure.

V.3.3. Accumulation des éléments par unité de surface

Les masses de matière sèche diffèrent considérablement entre les tissus d'une tige, suivant les indications de la **Figure 5.10** ou du **Tableau 5.2** pour une unité de surface de tige donnée.

La connaissance de la masse de matière sèche des différents tissus de tige nous a permis d'évaluer, non seulement la concentration des éléments dans chaque tissu, mais aussi leur distribution quantitative dans chaque tissu à l'intérieur de la tige, par unité de surface de suber. Cette évaluation illustre les échanges possibles entre les contaminants atmosphériques et les parties internes de la tige. Si l'on considère la répartition du Pb (**Figure 5.10**) : 31% du stock total (superficiel + interne) se situe dans le dépôt superficiel, 42% dans les tissus de l'écorce et 27% dans le bois.

Le gradient décroissant de concentration, du suber au bois (**Figure 5.9**), est associé à une accumulation à long terme du Pb qui semble diffuser ou être transporté très lentement dans les tissus internes.

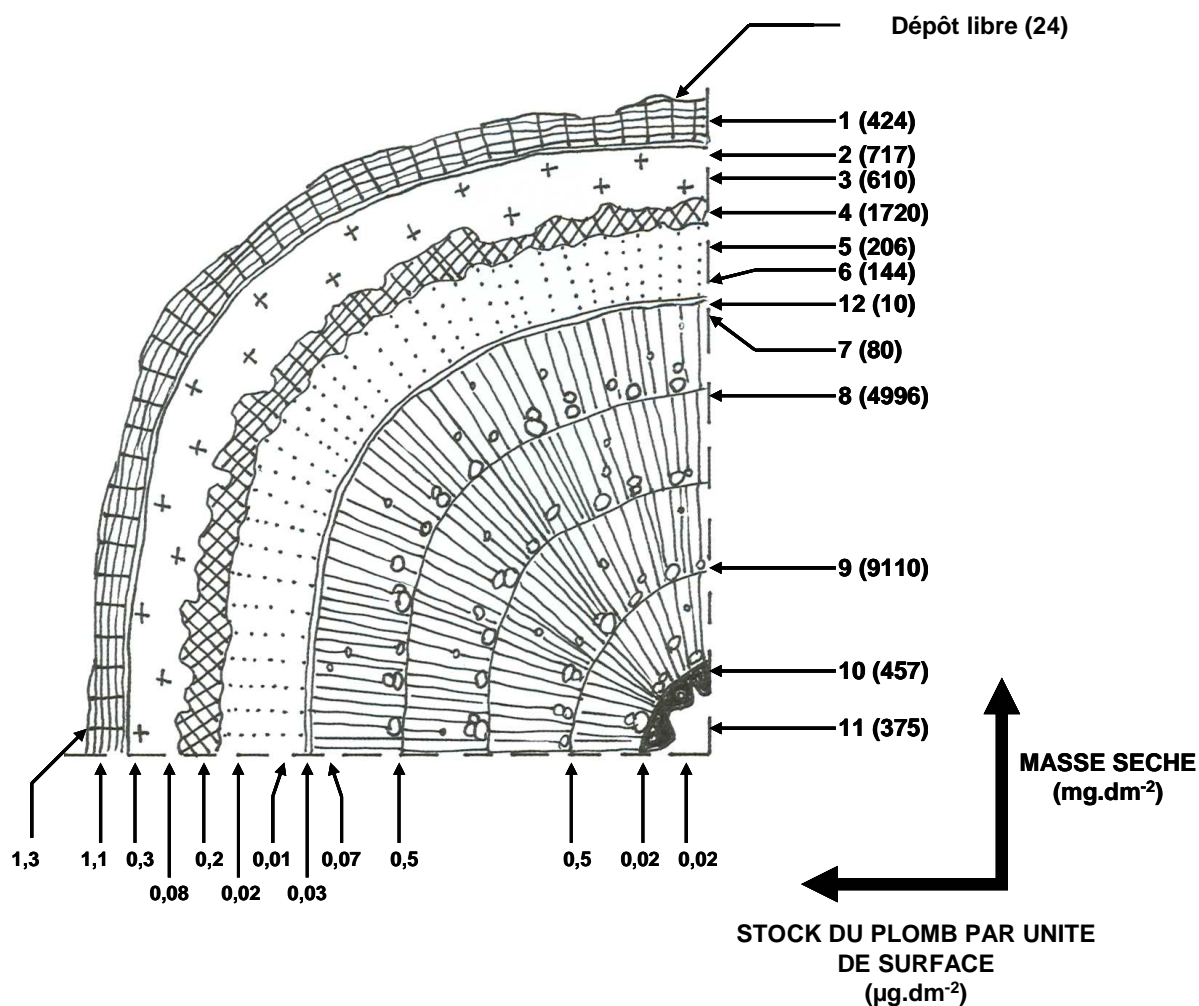


Figure 5.10 : Schéma montrant la structure anatomique et la teneur en plomb dans une tige de 4 ans (*Fraxinus excelsior* L.). Axe vertical: 1: Suber; 2: Parenchyme; 3: Collenchyme; 4: Fibres (+ Collenchyme); 5: Phloème (+ Fibres); 6: Zone cambiale (+ Phloème); 7: Zone cambiale pure; 8: Bois externe; 9: Bois interne; 10: Xylème I; 11: Moelle; 12: Zone cambiale pure. Axe vertical : masse sèche des différents tissus correspondant à 1 dm² de surface de suber (mg.dm⁻²). Axe horizontal : contenu en plomb (µg) dans chaque fraction pour 1 dm².

La comparaison suber/bois, en ce qu'elle traduit le rapport de deux espaces apoplastiques de même âge, l'un interne, l'autre externe (chimiquement non semblables néanmoins), étaye fortement cette interprétation. Le rapport des stocks de Pb suber/bois qui est égal à 1,1/1 (alors que le rapport des concentrations par rapport à la masse est de 2,5/0,06) montre que l'hypothétique transfert du suber vers le bois pourrait déplacer 47% du stock total dans l'hypothèse où la fourniture racinaire serait négligeable.

Tableau 5.2 : Concentration de 14 éléments (V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Sb, Ba, Ti, Pb) par unité de surface ($\mu\text{g}/\text{dm}^2$) dans le dépôt superficiel et dans les différents tissus d'une tige

Fraction N°	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Sb	Ba	Ti	Pb	Fraction tissulaire
D	1,42 ±0,02	1,08 ±0,01	4,13 ±0,04	246 ±4	0,15 ±0,01	1,03 ±0,02	3,51 ±0,03	7,42 ±0,04	0,13 ±0,03	0,034 ±0,003	0,007 ±0,003	3,80 ±0,01	0,020 ±0,001	1,28 ±0,01	Dépôt fibre
1	0,10 ±0,01	0,38 ±0,02	22,5 ±5,0	84,2 ±6,3	0,27 ±0,01	0,6 ±0,3	6,3 ±0,9	12,2 ±3,3	0,04 ±0,01	0,08 ±0,04	0,08 ±0,03	5,8 ±0,7	0,0037 ±0,0007	1,1 ±0,2	Suber
2	0,03 ±0,03	0,23 ±0,16	10,8 ±1,9	63,2 ±40,7	0,09 ±0,08	0,4 ±0,3	5,6 ±1,9	12,7 ±6,6	0,03 ±0,01	0,05 ±0,04	0,03 ±0,02	26,7 ±12,6	0,0014 ±0,0007	0,3 ±0,2	Parenchyme
3	0,007 ±0,003	0,14 ±0,04	6,5 ±3,3	37,8 ±1,5	0,06 ±0,05	0,39 ±0,05	5,7 ±1,4	18,1 ±4,4	0,02 ±0,01	0,02 ±0,01	0,013 ±0,001	20,9 ±2,2	0,0007 ±0,0001	0,08 ±0,02	Collenchyme
4	0,005 ±0,001	0,30 ±0,07	22,8 ±3,8	96,4 ±14,8	0,14 ±0,08	1,2 ±0,5	18,4 ±2,9	45,7 ±4,3	0,04 ±0,01	0,076 ±0,005	0,05 ±0,04	33,5 ±10,1	0,00169 ±0,00004	0,20 ±0,02	Fibres (+ Collenchyme)
5	0,0005 ±0,0001	0,04 ±0,01	2,2 ±0,3	15,3 ±1,9	0,02 ±0,02	0,2 ±0,1	3,6 ±0,5	6,6 ±0,9	0,008 ±0,002	0,01 ±0,03	0,01 ±0,01	4,5 ±0,4	0,00022 ±0,00003	0,02 ±0,01	Phloème (+ Fibres)
6	0,0004 ±0,0002	0,03 ±0,02	1,1 ±0,9	10,5 ±7,9	0,01 ±0,005	0,2 ±0,1	2,8 ±2,8	4,8 ±3,7	0,01 ±0,01	0,005 ±0,002	0,002 ±0,001	2,1 ±1,7	0,0002 ±0,0001	0,01 ±0,01	Zone cambiale (+ Phloème)
E1	0,143	1,12	65,9	307,4	0,59	3	42,4	100,1	0,148	0,241	0,185	93,5	0,0079	1,71	I corce
12	0,0020 ±0,0009	0,020 ±0,001	0,14 ±0,03	1,8 ±0,4	0,003 ±0,001	0,07 ±0,04	0,44 ±0,05	0,82 ±0,03	0,006 ±0,002	0,005 ±0,001	0,003 ±0,001	0,12 ±0,01	0,000043 ±0,000004	0,03 ±0,01	Zone cambiale pure
7	0,0014 ±0,0002	0,040 ±0,001	0,62 ±0,09	6,7 ±1,9	0,010 ±0,003	0,26 ±0,04	1,9 ±0,5	4,7 ±2,1	0,006 ±0,002	0,020 ±0,002	0,007 ±0,004	0,8 ±0,3	0,0003 ±0,0001	0,07 ±0,02	Zone cambiale (+ Xylème)
8	0,015 ±0,005	1,04 ±0,13	6,1 ±2,2	41,4 ±23,8	0,08 ±0,07	1,3 ±1,2	25,4 ±5,3	32,4 ±13,8	0,14 ±0,08	0,13 ±0,08	0,09 ±0,07	14,6 ±6,0	0,0025 ±0,0006	0,5 ±0,2	Bois externe
9	0,021 ±0,008	1,9 ±1,8	8,3 ±5,0	32,9 ±12,7	0,1 ±0,1	1,7 ±1,9	32,0 ±27,5	33,8 ±12,1	0,15 ±0,03	0,1 ±0,1	0,05 ±0,03	17,6 ±12,5	0,005 ±0,001	0,5 ±0,4	Bois interne
10	0,0010 ±0,0006	0,12 ±0,11	0,6 ±0,2	10,9 ±7,4	0,01 ±0,01	1,7 ±1,8	1,4 ±0,6	0,9 ±0,2	0,010 ±0,001	0,004 ±0,003	0,011 ±0,005	1,3 ±0,6	0,00023 ±0,00009	0,02 ±0,01	Xylème I
11	0,0008 ±0,0005	0,12 ±0,09	0,80 ±0,11	8,7 ±3,8	0,010 ±0,007	0,1 ±0,1	1,874 ±0,004	0,7 ±0,4	0,008 ±0,002	0,002 ±0,001	0,01 ±0,01	2,1 ±0,4	0,00018 ±0,00008	0,02 ±0,01	Moelle
E2	0,0392	3,22	16,56	100,6	0,21	5,06	62,57	72,5	0,314	0,256	0,168	36,4	0,0082	1,11	Cylindre central
Rapport (%) (E1+E2)/Total	11,4	80,1	95,2	62,4	84,2	88,7	96,8	95,9	78	93,6	98,1	97,2	44,6	68,8	Contenu interne / Total (%)

Le **Tableau 5.2** montre la quantité des éléments fréquemment impliqués dans la contamination atmosphérique par unité de surface de la tige. La ligne "D" représente le stock par unité de surface du dépôt superficiel. En bas de tableau, la ligne " $\Sigma 1 + \Sigma 2 / \text{total}$ " représente le rapport entre le stock interne et le contenu total, dépôt superficiel compris. Ce rapport subit des variations d'un facteur 10 en fonction de la nature des éléments étudiés : pour 6 des éléments étudiés (Mn, Cu, Zn, Cd, Sb et Ba) le stock interne représente plus de 90% du total ; pour Cr, Co, Ni, il représente plus de 80% ; pour Fe, As et Pb il est compris entre 60 et 80%. Le vanadium est essentiellement externe.

Ces résultats démontrent que, pour la plupart des éléments dosés, au moment où les prélèvements ont été faits, le dépôt libre ne représente que 10 à 20% de ce qui a été intégré. L'exception du vanadium suggère que cet élément pourrait résulter d'une pollution récente, éventuellement ponctuelle. De plus, cet élément est très peu mobile à l'intérieur des tiges (**Figure 5.10**). Si nous calculons le rapport du contenu "cylindre central" sur le contenu "écorce", la valeur la plus basse est obtenue pour V (0,22) et la plus haute pour Cr (2,9). La valeur moyenne pour l'ensemble des éléments étudiés est de $1,02 \pm 0,8$. Ceci prouve que l'accumulation de certains éléments tels que V, Mn, Fe, Co, Ba et Pb est la plupart du temps observée dans l'écorce et que l'accumulation dans le bois n'est jamais négligeable et atteint des valeurs très élevées dans le cas de Cr, As, Ni, Cu. Dans le cas de Cr, c'est le chrome total qui est dosé mais seuls certains dérivés pourraient être très hydrosolubles et être, ainsi, très mobiles.

Au total, on voit que des quantités importantes d'éléments sont accumulés à l'intérieur des tiges, avec une réversibilité que l'on peut considérer comme faible, eu égard à la présence de subérine imperméable tapissant la surface des tiges, mais non nulle sachant qu'un flux transpiratoire, apoplastique, existe. Une part importante des éléments présents est issue de l'apport atmosphérique et se distribue suivant un gradient de concentration, de la surface vers l'intérieur. Un stock "physiologique", cytoplasmique, concernant tous les éléments est présent dans les cellules vivantes à forte activité métabolique, non dans les parois mais dans le cytoplasme, avec la représentation la plus caractéristique dans le cambium où la paroi est minimale. Ce stock doit être régulé par la membrane biologique périphérique, le plasmalemme. On peut supposer qu'il est alimenté par la sève brute en grande partie.

La relation entre le contenu interne des tiges et le dépôt de surface est visiblement complexe et variable dans le temps : dans les lots que nous avons étudiés, le stock de surface est bien inférieur au stock interne mais la concentration dans le dépôt de surface est généralement supérieure à celle des tissus immédiatement sous-jacents. Il peut exister des différences

qualitatives marquantes (cas du vanadium). Quantitativement, il est clair que le dépôt de surface est influencé par la météorologie. Il comporte des particules solides dont les possibilités d'intégration seront considérées au chapitre VII.

La **figure 5.11** suggère que le transfert interne puisse être basé principalement sur un mécanisme de diffusion régi par la loi de Fick et les équilibres de Donan, et une concurrence avec des processus d'adsorption/partition impliquant la charge négative et la lipophilie des parois cellulaires du suber. Dans des couches plus profondes et symplasmiques telles que le phloème, le pH acide (physiologiquement contrôlé) de l'espace entre la paroi cellulaire et la membrane des cellules peut favoriser la solubilité et la mobilité des ions.

Les travaux de divers auteurs montrent d'ailleurs que le pH des écorces joue un rôle : une bonne corrélation a été trouvée entre le pH et la concentration en cations dans les écorces d'arbres (Farmer *et al.*, 1991). Quand le pH de l'écorce est faible, la quantité de cations échangeables est également faible, et vice versa. En plus d'être modifié par les apports polluants, le pH est aussi affecté par l'espèce de l'arbre, l'âge et la santé de l'arbre, les conditions météorologiques, le substrat, et l'épaisseur de l'échantillon (Stäxang, 1969 ; Grodzińska, 1982). En raison de sa faible acidité, l'écorce des arbres à feuilles caduques est plus sensible aux changements de pH que celle des conifères (Härtel et Grill 1972).

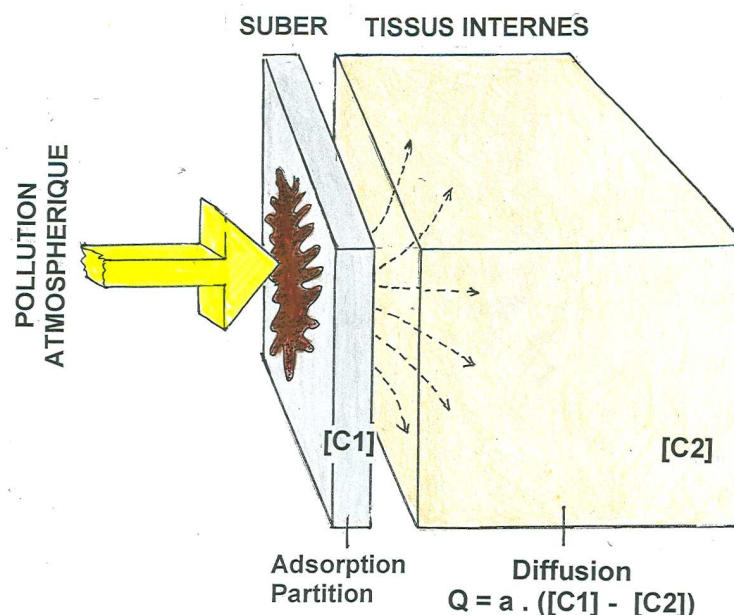


Figure 5.11 : Intégration et diffusion des éléments du dépôt de surface vers les tissus internes.
 $Q = \delta q / \delta t$ = flux de transfert ; a = coefficient spécifique de diffusion ;
 $[C1]$ et $[C2]$ concentrations.

La **figure 5.11** illustre le processus supposé aboutir à des processus de distribution : la subérine caractéristique du suber est un composé lipophile, chargé négativement ($-\text{COOH}/\text{COO}^-$ libres), capable de réaliser des liaisons ioniques avec des cations. Le plomb serait un des cations les plus fortement retenus grâce à ce mécanisme. Ce phénomène d'immobilisation dans le suber est en compétition avec des possibilités de diffusion dont l'intensité sera fonction de la solubilité dans l'eau de l'ion considéré et de sa différence de concentration entre le compartiment subérien donneur ($[\text{C1}]$) et les compartiments receveurs, le bois par exemple ($[\text{C2}]$) en fonction de la loi de Fick (Quantité transportée/h = a.([C1] - [C2])).

Eu égard à la masse très différente des tissus analysés (la masse la plus forte étant celle du bois = 78% du total pour une tige de 4 ans), il semble bien que cette mobilisation des ions vers l'intérieur puisse avoir des conséquences nettes, par exemple dans le cas du plomb.

Dans un processus aussi complexe, la pluie joue probablement un rôle favorable, dissolvant en partie le dépôt externe et le distribuant au-dessous sur une plus grande surface d'écorce (Lindberg *et al.*, 1989). L'adsorption dépend de la nature de l'élément, de sa charge électrique et de sa solubilité dans l'eau. Ceci explique probablement la distribution radiale observée ici notamment pour le Pb (**Figure 5.10**). Une situation comparable a aussi été observée par Harju *et al.*, (2002) dans les écorces de Pin sylvestre. Dans l'ensemble, l'existence d'un gradient de concentration du suber aux tissus internes est en accord avec la présence d'une source atmosphérique importante.

Dans cette situation complexe, pour estimer le degré de contamination atmosphérique des tiges dans notre station du campus, nous avons choisi : 1) de comparer les accumulations élémentaires dans les tiges d'arbres se développant dans des atmosphères supposées peu polluées, (en particulier en salle conditionnée) ; 2) de réaliser l'analyse de la sève brute ou de fractions comparables, pour connaître la composition du mélange élémentaire extrait du sol par les racines ; 3) d'analyser le contenu élémentaire du sol de notre station.

V.4. Recherche d'un profil élémentaire pour le frêne en absence d'apport polluant atmosphérique

Une part de l'ensemble élémentaire des tiges provient, via la sève brute, d'une absorption racinaire dans le sol et l'eau du sol. La question que nous nous sommes posée est : quelle est la composition élémentaire des tiges de frêne en absence de pollution

atmosphérique et d'apport minéral polluant à partir du sol ? Pour y répondre, nous avons cultivé pendant 2 ans de jeunes plantes de frênes, en salle conditionnée, sur terreau standard commercial. Après fractionnement des tiges (vu dans la **Figure 5.6**), puis en regroupant les tissus en 3 unités (suber, tissus vivants du parenchyme jusqu'au cambium et enfin bois plus moelle), soit sur les plantes de salle conditionnée, soit sur les plantes poussées dans la station du campus, à l'extérieur, nous établissons le tableau comparatif montrant le rapport des concentrations de chaque élément entre l'extérieur et la salle conditionnée (**Tableau 5.3**). Les éléments sont classés en fonction de la valeur du rapport calculé (teneurs station / teneurs salle conditionnée).

Tableau 5.3 : Rapport des concentrations de chaque élément étudié dans des tiges de frênes poussés sur la station (St) et celle des frênes comparables poussés en salle conditionnée (SC).
S+ : distribution très fortement subérienne ; S : distribution subérienne surtout ;
U : distribution uniforme dans les 3 groupes de tissus

	St/SC Suber	St/SC Tissus vivants	St/SC Bois + moelle	Caractéristique de distribution
Sb	12,7	27,0	13,0	U
Fe	8,3	2,2	0,34	S
V	8,0	7,5	1,5	S+
Pb	7,6	1,8	1,2	S
Cr	6,4	3,4	2,3	S
Al	5,9	1,3	1,2	S
Co	4,3	3,3	4,0	U
Cu	3,4	6,7	2,9	U
Ba	1,9	1,7	1,8	U
Ni	1,5	2,0	2,3	U
Zn	1,3	0,96	0,19	S+
Ti	1,1	1,13	0,68	U
Ca	0,94	1,2	0,56	U
As	0,75	0,5	0,44	U
K	0,39	1,4	0,39	U
Mg	0,26	0,83	0,58	U
Mn	0,33	0,39	0,18	S+
Cd	0,44	0,35	0,25	U

Dans le suber, les éléments fortement concentrés sur la station du campus sont Sb, Fe, V, Pb, Cr, Al et Cu. Pour Al, le résultat suggère une présence sous forme d'argile à l'état solide. V, Zn et Mn connaissent une accumulation forte concernant le suber mais aussi dans les cellules vivantes sous-jacentes. Une distribution assez large dans les 3 types de tissus (U) apparaît pour Sb, Co, Cu, Ba, Ni, Ca, As, K, Mg et Cd. Dans ce cas, deux causes peuvent être invoquées : a) la forte diffusibilité dans l'eau de l'élément (K, Ni, Cu), b) une absorption racinaire pouvant être dominante (Mg, K,...). Les conditions de la salle de culture (température, humidité relative, luminosité) autorisent une croissance plus rapide des frênes

qu'à l'extérieur. Ceci se traduit également par une augmentation de la concentration subérienne du K (2,5 fois plus) due à une forte transpiration en particulier trans-subérienne.

Il n'existe pas de relation simple entre la composition élémentaire des tiges et celle du sol : le sol du campus est globalement bien plus riche que le terreau utilisé en salle (150 fois plus de fer, 85 fois plus de titane, 19 fois plus de K, 11 fois plus de plomb, 2,4 fois plus de Cu). Cependant, la composition des tiges apparaît comme fortement régulée physiologiquement (en ce qui concerne le symplasme). Ainsi le K des tiges reste comparable entre station et salle ; le Mg est 14 fois plus fort dans le sol sur le terrain cependant, sa concentration est plus forte dans les tiges de la salle conditionnée.

Quatre lavages des vaisseaux du bois, sous pression, par l'eau distillée, nous donnent une solution qui est, au moins partiellement représentative de la sève brute. La composition de son extrait sec mentionnée dans le **Tableau 5.4** illustre clairement cette situation régulée.

Tableau 5.4 : Composition de l'extrait sec ($\mu\text{g.g}^{-1}$) obtenu par lavage à l'eau distillée des vaisseaux du bois de tiges de frêne de 4 ans

	≥ 1000		$100 < < 1000$		$10 < < 100$		< 10
K	79300	Fe	500	Mn	55	Cr	5,5
Ca	22000	Zn	425	Ba	36	As	1,8
Mg	7900	Cu	168	Ti	23	Sb	1,8
		Al	167	Pb	16	V	1,1
						Cu	1,1
						Cd	0,5

Ainsi, une part très forte des éléments du sol reste très difficilement extractible par le frêne. D'autres éléments, au contraire, (K, Mg...) sont sélectivement absorbés. Le passage vers le symplasme de tige est lui aussi contrôlé : le rapport Ca/Zn dans les vaisseaux du bois est ainsi de 52 et, dans les tissus vivants de la tige (parenchyme + liber), il atteint 400.

Par ailleurs, la présence de Al et Si en concentration notable dans le lavage des vaisseaux du bois du dernier cerne qui transporte l'essentiel de la sève brute suggère qu'un accès partiel de composés argileux par les lésions racinaires, doit se produire, ce qui mène à penser que le strict contrôle d'entrée symplasmique se produit au niveau des tissus vivants des tiges uniquement. De la sorte, il est probable que la formule réelle de composition de la sève brute circulante puisse être bien moins riche en éléments traces que ne le suggère la composition de la solution de lavage des vaisseaux du bois qui pourraient contenir une fraction particulière sédimentée dans des "zones pièges" de leur lumière interne.

V.5. Discussion

A ce stade de la réflexion, plusieurs points émergent :

- il existe un ensemble d'éléments peu mobiles, qui sont nettement concentrés dans le suber et sont, à l'évidence, issus de l'apport atmosphérique (Fe, V, Pb, Cr, Al).
- Pour d'autres éléments, la distribution interne est plus homogène, si bien que le partage entre origine atmosphérique et origine racinaire reste imprécis (Ni, Cd, Zn, Cu, même Fe).
- Pour d'autres éléments enfin, qui sont les éléments physiologiques majeurs (K, Ca, Mg, P...), la fourniture racinaire est dominante et peut même être à l'origine d'un enrichissement du dépôt libre par transpiration transsubérienne et par les lenticelles.

Si l'on compare la composition élémentaire subérienne à la composition du dépôt libre, il n'existe pas de différence évidente, sauf peut-être pour le vanadium. On sait pourtant que le dépôt libre est à "géométrie variable" au gré des aléas météorologiques. Cependant, statistiquement, il donne, (d'une manière sans doute moins stable) l'image d'une pollution de fond de l'atmosphère grenobloise, qui apparaît comme un mélange homogénéisé issu d'origines multiples, image de ce qu'est une atmosphère urbaine actuelle.

Chapitre VI

Le mélange d'éléments atmosphériques d'origine anthropique présents sur et dans les tiges d'arbres. Essai d'évaluation qualitative et quantitative

Sommaire

VI.1. Introduction	140
VI.2. Principe d'une estimation approximative de l'AAEF	141
VI.3. Résultats	145
VI.4. Discussion	149

VI.1. Introduction

Dans les matrices étudiées dans les chapitres IV et V, l'analyse élémentaire permet d'exprimer la quantité de chaque élément dosé par une grandeur qui est la concentration. Cette grandeur est le résultat d'un rapport entre la quantité de l'élément considéré et la masse de la matrice. Ainsi, ce rapport peut augmenter par un apport atmosphérique anormalement élevé de l'élément considéré mais peut aussi augmenter par décroissance d'un des constituants de la masse (par exemple, la matière organique) pauvre en éléments dosés.

L'analyse de la concentration est et a été très utile, dans les situations soumises à une pollution minérale marquée (proximité de mine, d'industrie métallurgique, de volcans...). Elle trouve vite ses limites dans des situations plus sensibles. Une autre grandeur simple à calculer est l'expression de la quantité d'un élément par unité de surface d'écorce qui peut illustrer plus directement la masse de l'élément issue de l'atmosphère qui s'est transférée après un temps "t" sur et dans l'écorce.

Cependant, toutes les matrices analysées dans ce travail ont montré qu'elles avaient une composition complexe où l'ensemble des éléments d'origine anthropique pouvait être minoritaire et très difficile à évaluer avec précision. Une démarche, théoriquement classique, pourrait consister à comparer le contenu élémentaire d'un arbre soumis à la pollution atmosphérique à celui d'un arbre maintenu pendant le même temps en atmosphère non polluée (arbre témoin). Cette expérience décrite dans le chapitre V est, en fait, très lourde et ne permet pas de conclusion immédiate du fait de l'intervention de multiples facteurs (composition du sol, vitesse de croissance, transpiration, caractéristiques du repos hivernal). Il faut donc admettre que le "bon témoin" est irréaliste, ou au moins, qu'il a un "prix de revient" très élevé.

Nous nous sommes donc orientés vers une autre démarche d'évaluation de l'apport élémentaire anthropique sur et dans l'écorce. Son principe est le suivant : toutes les matrices sur et dans les écorces sont constituées de 3 catégories de composants : a) une part minérale issue de la croûte terrestre, représentant fréquemment 10% de la masse du dépôt de surface ; b) une part organique, vivante ou morte, très abondante (80 à 95% de la masse) représentée dans le dépôt de surface par des microorganismes, des champignons, des algues, des débris végétaux ou animaux, de l'humus. Dans le suber, elle est essentiellement constituée par des parois végétales de cellules mortes, imprégnées de subérine. Toute cette matière organique contient, structurellement, des éléments, en grande quantité pour K, Ca, Mg, P, S, Fe et en

faible quantité pour Zn, Cu, Ni...) ; c) une troisième part, mélangée aux autres, ou intégrée à eux, représente la fraction élémentaire anthropique apportée par l'atmosphère. Les 3 fractions mentionnées ci-dessus seront désignées par les sigles abrégés suivants : AGF (Atmospheric Geogenic Fraction), OM (Organic Matter), AAEF (Atmosphéric Anthropic Elements Fraction) (Catinon *et al.*, 2008) comme décrit dans le chapitre III (**Figure 3.5**).

VI.2. Principe d'une estimation approximative de l'AAEF

Nous avons conçu une méthode d'approche en 3 étapes :

1. Détermination de la masse de l'OM et de l'AGF dans 1g de matrice.

L'OM est mesurée avec précision par différence entre la masse sèche initiale et la masse de cendres (24H à 550°C). La masse de l'AGF est estimée à partir de la teneur de l'échantillon en silice et aluminium. La silice et l'aluminium biologiques sont en teneurs négligeables (en tout cas chez le frêne dans nos conditions). L'emploi d'un paramètre de relation masse géogénique/silice permet d'estimer la masse approchée de l'AGF à partir de la valeur de dosage de Si. La masse de l'AAEF est obtenue par différence : masse AAEF = masse totale des éléments contenus dans les cendres - (masse élémentaire de l'AGF + masse élémentaire de l'OM).

2. Calcul du contenu élémentaire (AGF + OM) dans la fraction.

La démarche consiste à établir des formules de référence de composition élémentaire pour l'OM et l'AGF. Pour l'OM, d'importantes compilations (Markert, 1992 ; Bargagli, 1998a) donnent des valeurs moyennes pour le matériel végétal de nombreuses espèces. Pour le frêne, nous avons fait nos propres déterminations (chapitre V) ainsi que pour différentes matrices animales ou mixtes, qui diffèrent des premières surtout par la baisse de K et l'élévation de Na. Pour l'AGF, des formules de composition moyenne de la croûte terrestre existent (Taylor et McLennan, 1985 ; Esser et Turekian, 1993 ; Jochum *et al.*, 1993). Elles sont rapidement apparues insuffisantes et nous les avons modifiées en tenant compte de la composition du sol superficiel de la station étudiée. Une fois ces formules établies, on les utilise pour calculer la teneur en éléments de la somme AGF + OM dans l'échantillon étudié. La validité des formules employées est évaluée en observant si, pour les éléments majeurs, des valeurs anormales apparaissent (ex : pour un élément, cas où Σ éléments de l'AGF + OM > contenu en élément de l'échantillon étudié). Le calage porte essentiellement sur K, Ca, Mg, Al, Fe.

3. Calcul de la masse élémentaire correspondant à l'AAEF.

On calcule, pour chaque élément, la masse qui revient à l'AAEF dans 1g de masse sèche de l'échantillon. On en déduit ; a) la concentration de chaque élément dans l'AAEF, qui devrait rendre compte de la composition atmosphérique en éléments polluants d'origine anthropique ; b) pour chaque élément, la proportion de celui-ci qui est anthropique, par rapport au total présent. La **Figure 6.1** résume l'ensemble de la démarche.

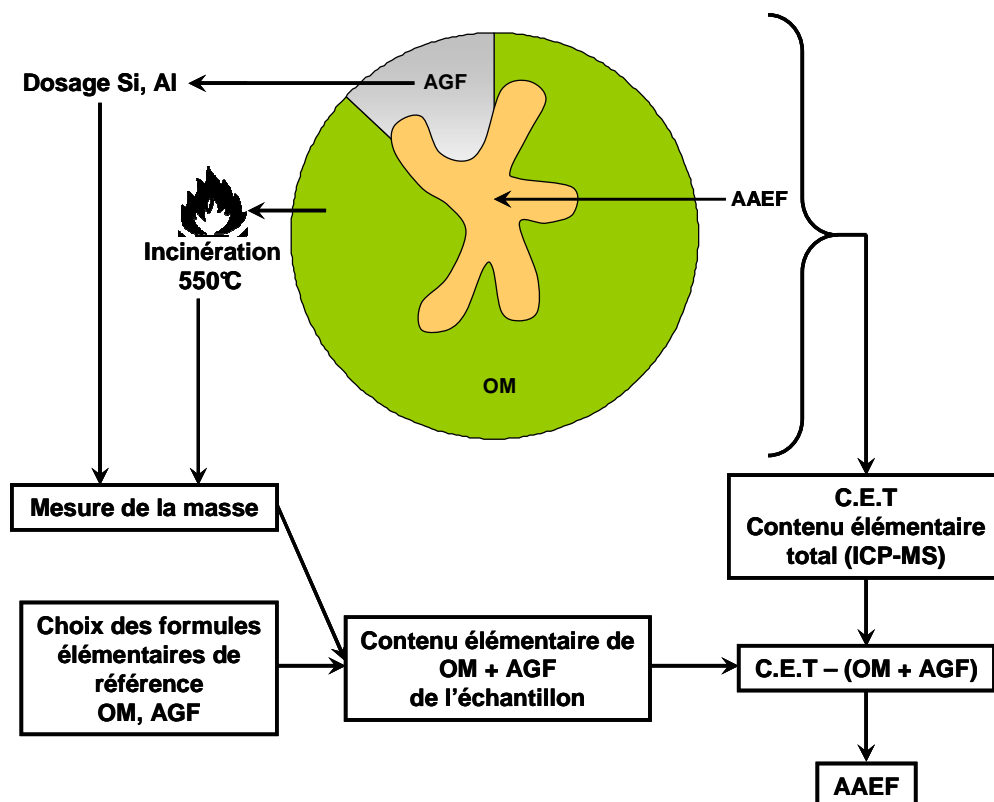


Figure 6.1 : Schéma de synthèse de la démarche de calcul d'AAEF ; OM, organic matter; AGF, atmospheric geogenic fraction; AAEF, anthropic atmospheric elemental fraction ; CET, contenu élémentaire total.

A partir de la proportion des trois fractions dans l'échantillon et des formules de références décrites dans le chapitre III (**Tableau 6.1**), l'estimation de la part de chaque élément qui peut être attribué à l'AAEF été calculée par exemple pour le dépôt de surface de frênes du campus (**Tableau 6.2**).

Tableau 6.1 : Composition élémentaire (en $\mu\text{g.g}^{-1}$) des formules de référence de la matière organique et de la fraction géogénique. OM, organic matter ; AGF, atmospheric geogenic fraction

Elément	OM	AGF	AGF ajustée
K	8000	46500	19600
Ca	6000	132600	78500
Mg	1500	27700	15700
Si	500	497600	607200
Mn	80	2200	1100
Na	155	18800	13000
Fe	125	89500	86000
Al	50	170100	165800
Ti	12	13100	10900
Zn	57	200	200
Sr	30	390	290
Rb	30	170	79
Ba	30	680	670
Cu	12	67	67
Ni	1,8	74	73
Cr	1,8	130	127
Pb	0,5	117	65
V	0,55	145	65
Mo	0,8	2,2	1,3
Ce	0,55	100	65
W	0,22	4,9	4,9
Sn	0,14	13,7	6,5
La	0,24	51	40
Cs	0,22	12,4	6,5
Co	0,22	24	23
Zr	0,063	244	238
Sb	0,1	6,4	2,8
Ga	0,1	28	20
As	0,1	51	20
Hf	0,06	6,6	6,5
Cd	0,04	0,5	0,5
Sm	0,045	8,8	7,2
U	0,01	4,3	3,8

Pour plus de simplicité nous allons prendre un exemple de calcul d'AAEF, celui du cuivre dans un échantillon de dépôt de surface sur l'écorce de frêne du campus. La mesure est effectuée sur 1 g de matière sèche de dépôt. Le dosage par ICP-MS donne pour Cu $102 \mu\text{g.g}^{-1}$ (première colonne du **Tableau 6.2**).

1 g de dépôt incinéré donne 187 mg de cendres. Ces cendres contiennent l'essentiel des éléments. La plupart sont transformés en oxydes ce qui entraîne un gain de masse. Le spectre global EDX de ces cendres montre que l'oxygène correspond approximativement à 23% de la masse de cendres. Les éléments représentent ainsi 144 mg.

On évalue alors la masse de l'AGF, en référence à la teneur en silice qui est de $60700 \mu\text{g.g}^{-1}$. La teneur minérale totale de l'AGF est associée à la silice par un facteur de 1,65 (calcul à partir du sol de la station). Soit une masse minérale de l'AGF de $60,7 \text{ mg} \times 1,65 = 100 \text{ mg}$.

Le contenu en matière organique de 1 g de dépôt est de 856 mg. On évalue alors la masse minérale correspondant à la matière organique, soit 16,59 ‰ (formule OM **Tableau 6.1**) donc, dans 1 g de dépôt il y a $16,59 \text{ mg} \times 0,856 = 14,2 \text{ mg}$ d'éléments constitutifs de la matière organique.

On évalue alors par différence l'AAEF : $\text{AAEF} = \text{masse minérale totale} - (\text{masse minérale de l'AGF} + \text{masse minérale de la matière organique})$. $\text{AAEF} = 144 \text{ mg} - (100 \text{ mg} + 14,2 \text{ mg}) = 29,8 \text{ mg}$.

La teneur en cuivre fixée dans les formules de référence est de $12 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour la matière organique et de $67 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour l'AGF (**Tableau 6.1**). Dans l'échantillon étudié, le cuivre constitutif de la matière organique est donc estimé à $12 \times 0,856 = 10,3 \mu\text{g}$, il est estimé dans l'AGF à $67 \times 0,100 = 6,7 \mu\text{g}$ (deuxième et troisième colonne du **Tableau 6.2**).

On en déduit la masse de cuivre contenue dans l'AAEF soit la masse totale de Cu dans 1 g d'échantillon moins le contenu en Cu de AGF + MO soit : $102 \mu\text{g} - (10,3 + 6,7) = 85 \mu\text{g}$ de Cu issu de l'AAEF (dernière colonne du **Tableau 6.2**), ce qui représente 83,3% du stock de cuivre de l'échantillon ($((85 / 102) \times 100) = 83,3\%$). Le cuivre apparaît ainsi comme très majoritairement anthropique dans cet échantillon.

Tableau 6.2 : Etapes du calcul de l'AAEF pour un dépôt de surface sur écorce (campus)

Eléments	Dépôt (mg.kg ⁻¹)	AGF	MO	(AGF + MO)	AAEF
Si	60700	60270	428	61148	0
Ca	13300	7850	5136	12986	314
Fe	11300	8600	107	8707	2593
K	7750	1960	6848	8808	0
Mg	3600	1570	1284	2854	746
Na	1930	1300	133	1433	497
Ti	1160	1090	10	1100	60
Zn	351	20	49	69	282
Mn	243	110	69	179	64
Ba	157	67	24	93	64
Cu	102	6,7	10,3	17	85
Sr	59	29	26	55	4
Pb	49	6,5	0,4	6,9	42
Cr	47	12,7	1,5	14,2	33
Zr	45	24	0,1	24,1	21
V	39	6,5	0,5	7	32
Ni	27	7,4	1,5	8,8	18
Rb	25	7,3	26	33,9	0
Ce	15	6,5	0,5	7	8
La	7,4	4,0	0,2	4,2	3,2
Sn	6,4	0,7	0,1	0,8	5,6
Co	5,7	2,3	0,2	2,5	3,2
Sb	5,1	0,3	0,1	0,4	4,7
As	4,5	2,0	0,1	2,1	2,4
Ga	3,7	2,0	0,1	2,1	1,6
Mo	2,4	0,1	0,7	0,8	1,6
W	2,3	0,5	0,2	0,7	1,6
Cs	1,6	0,7	0,2	0,9	0,7
Sm	1,2	0,7	0,04	0,7	0,5
Hf	1,1	0,7	0,05	0,8	0,3
Cd	0,9	0,05	0,03	0,1	0,8

VI.3. Résultats

VI.3.1. Proportion des éléments dans l'AAEF par rapport au total élémentaire du dépôt de surface (Tableau 6.2)

Le **Tableau 6.2** montre la contribution de l'AAEF au mélange élémentaire constituant le dépôt de surface chez des tiges de frêne de 1 à 40 ans de la station du campus. Si l'on considère les valeurs moyennes, on peut classer les éléments dans l'ordre décroissant du pourcentage AAEF/total (**Tableau 6.3**).

Dans le **Tableau 6.3**, on perçoit des tendances à la baisse de l'AAEF au cours des années récentes pour Sb, et des tendances inverses pour Pb, V, Ni, montrant un AAEF fort pour ces éléments dans les jeunes tiges (1 à 5 ans).

Tableau 6.3 : Valeurs d'AAEF (%) sur les dépôts libres récoltés sur des rameaux de frênes d'âges différents de la station campus. <LD : inférieur aux limites de détection lors du dosage ; ND : Non Dosé ; # : AAEF "indéterminable"

	Culot 1 an	Culot 2 ans	Culot 3 ans	Culot 4 ans	Culot 5 ans	Culot 5-10 ans	Culot 10-15 ans	Culot 15-20 ans	Culot 40 ans (1)	Culot 40 ans (2)	Moyenne ± E.T
Cd	97	94	96	96	94	82	<LD	<LD	78	86	90 ± 7
Sn	#	61	#	ND	<LD	89	86	94	89	90	85 ± 12
Pb	93	93	92	90	89	77	71	58	79	55	80 ± 14
Sb	67	93	43	#	51	94	93	87	96	94	80 ± 21
V	91	96	92	90	96	64	57	59	69	73	79 ± 16
Cu	93	89	93	91	85	44	52	57	83	93	78 ± 19
Zn	77	73	85	84	74	55	69	73	84	77	75 ± 9
Cr	75	75	76	75	73	66	65	70	71	74	72 ± 4
W	ND	ND	ND	ND	ND	62	69	72	73	62	68 ± 5
Ni	86	89	84	83	85	45	40	45	53	64	67 ± 20
Co	67	67	71	69	67	59	57	59	57	73	65 ± 6
Ti	#	50	#	#	#	74	69	66	62	63	64 ± 8
Ce	64	67	69	66	67	54	44	45	52	57	59 ± 9
As	62		61	60	55	<LD	22	52	52	68	54 ± 14
U	66	61	57	52	55	49	19	38	47	61	51 ± 14
La	57	60	61	57	58	47	33	35	42	50	50 ± 10
Mo	ND	ND	ND	ND	ND	4	57	60	86	42	50 ± 30
Zr	ND	ND	ND	ND	ND	51	40	43	48	63	49 ± 9
Cs	63	62	67	69	60	11	16	14	49	26	44 ± 24
Sm	56	60	61	60	56	37	19	18	38	36	44 ± 17
Ba	52	46	56	54	46	#	1	17	51	69	44 ± 21
Hf	ND	ND	ND	ND	ND	40	25	34	44	57	40 ± 12
Ga	ND	ND	ND	ND	ND	39	22	20	44	52	35 ± 14
Fe	32	48	36	31	32	44	33	31	18	21	33 ± 9
Sr	35	13	36	31	0	#	#	#	22	58	28 ± 19
Mn	#	6	16	20	7	38	55	56	35	7	27 ± 20
Ca	ND	ND	ND	ND	ND	#	2	11	8	64	21 ± 29
Mg	ND	ND	ND	ND	ND	9	14	15	31	22	18 ± 9
Na	ND	ND	ND	ND	ND	<LD	2	8	32	13	14 ± 13
K	ND	ND	ND	ND	ND	#	#	#	12	#	12
Rb	#	#	2	17	#	#	#	#	6	#	8 ± 8
Al	0	0	0	0	0	25	7	2	0	4	4 ± 8

Tableau 6.4 : Classement des éléments en fonction du rapport AAEF/échantillon total (%) dans le dépôt de surface sur des rameaux de frênes du campus

≥ 90%	90-80%	80-70%	70-60%	60-50%	50-40%	≤40%
Cd	Sn, Pb, Sb	V, Cu, Zn, Cr	W, Ni, Co, Ti	Ce, As, U, La, Mo	Zr, Cs, Sm, Ba, Hf	Ga, Fe, Sr, Mn, Ca, Mg, Na, K, Rb, Al

VI.3.2. Proportion des éléments dans l'AAEF dans le total élémentaire du suber

Le **Tableau 6.5** montre les valeurs d'AAEF/total (%) dans le suber des mêmes arbres de la station du campus que pour les **Tableaux 6.2 et 6.3**.

Tableau 6.5 : Valeurs d'AAEF (%) dans le suber récolté sur des rameaux de frênes de la station campus d'âges différents. # : AAEF "indéterminable"

	Suber 1 an	Suber 2 ans	Suber 3 ans	Suber 4 ans	Suber 5 ans	Suber 10 ans	Suber 15 ans	Suber 18 ans	Suber 40 ans (1)	Suber 40 ans (2)	Moyenne ± E.T
Sb	90	94	96	96	92	97	97	97	98	93	95 ± 3
Pb	78	87	90	90	86	94	93	96	94	95	90 ± 5
Cu	73	77	81	80	75	85	85	83	93	93	83 ± 7
V	78	76	80	78	78	82	81	83	85	90	81 ± 4
Co	18	76	78	77	81	80	77	85	82	93	75 ± 21
Cr	55	66	72	70	66	77	77	80	73	61	70 ± 8
Ba	42	61	61	56	76	72	60	77	80	93	68 ± 15
Cd	85	25	59	53	26	81	92	67	96	94	68 ± 27
Mn	#	49	53	60	74	80	76	75	63	58	65 ± 11
Zn	#	18	48	54	20	81	88	80	88	60	60 ± 27
As	#	39	37	45	#	53	52	40	72	48	48 ± 11
Ni	27	6	44	36	38	58	58	46	63	82	46 ± 21
Ca	#	13	14	17	39	50	26	53	62	80	39 ± 24
Fe	29	28	35	30	28	36	29	42	45	49	35 ± 8
K	51	48	41	19	15	12	#	17	34	54	32 ± 17
Mg	#	#	#	#	#	#	#	#	17	44	31 ± 19
Ti	#	2	22	22	#	37	35	27	29	#	25 ± 12
Al	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Au cours du temps, Sb se maintient à un niveau constant très élevé. Le Pb, atteignant une représentation supérieure à 94% au-delà de 10 ans subit une tendance à la décroissance (78 à 90%) dans les tiges plus jeunes, assez comparable au cas du Cu et du Ni. La décroissance la plus marquée concerne le Zn. Le **Tableau 6.6** classe les éléments en fonction du rapport (en %) AAEF/échantillon total.

Tableau 6.6 : Classement des éléments en fonction du rapport AAEF/échantillon total (%) dans le suber de rameaux de frênes du campus

≥ 90%	90-80%	80-70%	70-60%	50-40%	≤40%
Sb, Pb	Cu, V	Co, Cr	Ba, Cd, Mn, Zn	As, Ni	Ca, Fe, K, Mg, Ti

Si on compare les **Tableaux 6.4 et 6.6**, on constate que les éléments les plus hydrosolubles de l'AAEF (Cd et Zn) diminuent dans le suber. Par contre, la forte représentation des éléments sélectivement AAEF (Sb, Pb, Cu, V, Cr) se maintient de manière comparable entre dépôt de surface et suber.

VI.3.3. Comparaison au dépôt libre de frênes des Seiglières (1100 m alt., Belledonne)

Le **Tableau 6.7** classe les éléments comme pour les **Tableaux 6.4 et 6.6** en fonction de la concentration de l'AAEF.

Tableau 6.7 : Classement des éléments en fonction du rapport AAEF/échantillon total (%) dans le dépôt de surface sur des rameaux de frênes des Seiglières

90-80%	80-70%	70-60%	60-50%	50-40%	≤40%
Cd, Pb	Sb, V	Cu	Ni, Co, Cr	Mn, Ti	As, Ba, Ca, Zn, Mg, Fe

Le classement fait émerger un ordre très comparable à celui des **Tableaux 6.4 et 6.6**. Cependant, on voit une tendance à la décroissance de la contribution anthropique (la charge élémentaire déposée pour les éléments anthropiques est 8 fois inférieure par unité de surface à celle du campus).

VI.3.4. Comparaison au dépôt libre sur les parois du tunnel de L'Épine de l'autoroute A43

Cette comparaison permet de caler nos résultats par rapport à une signature du trafic automobile. Pour le calcul, l'AGF du tunnel est basée sur une argile hauterivienne très différente de celle du campus qui induit un changement de la formule de référence AGF.

Le **Tableau 6.8** présente le classement des éléments de l'AAEF comme pour les **Tableaux 6.4, 6.6 et 6.7**.

Tableau 6.8 : Classement des éléments en fonction du rapport AAEF/échantillon total (%) dans le dépôt de surface du tunnel de L'épine

≥ 90%	80-70%	70-60%	60-50%	≤40%
Cu, Sb, Ca, Pb, Zn, Sr, Mo, Cd, Sn	Ba, Cr, Na, Mg	Ni, Fe	Al	W, Mn, Ti, As, Co, K

Les éléments marquants de l'AAEF restent globalement comparables, à l'exception notable de V. Mo, Sr et Sn ont une représentation très forte. Le Zn est aussi très présent (faible lessivage ou Zn des glissières de sécurité). Ca et Ba pourraient témoigner : 1) d'un apport géogénique sous-estimé dans notre formule (calcaire jurassique ; tunnel non doublé) ; 2) des salages hivernaux en partie faits avec CaCl_2 .

Au total, le profil détaillé des dépôts issus de l'atmosphère du campus ne présente nullement une analogie stricte avec les apports du trafic automobile, malgré l'autoroute jouxtant le campus et l'Isère.

VI.3.5. Concentrations élémentaires dans l'AAEF

La concentration de chaque élément dans l'AAEF devrait faire apparaître une distribution quantitative qu'on pourrait comparer au contenu des éléments d'origine anthropique dans l'air et qui pourrait contribuer à l'identification de sources polluantes majeures (signatures) et à la compréhension de la dynamique de distribution spatiale. C'est donc un paramètre digne d'attention.

VI.4. Discussion

L'approche réalisée dans ce chapitre démontre la nécessité de dépasser la simple expression de la concentration en éléments traces d'origine atmosphérique dans les différentes matrices considérées. La raison en est que les 3 composantes : anthropogénique, géogénique et biologique sont dans les mêmes ordres de grandeur et qu'elles engendrent ainsi un ensemble très complexe, non directement lisible.

La mise en place d'une procédure de calcul d'AAEF en est au stade de la mise au point expérimentale : les options prises n'ont sans doute rien de définitif. Les formules choisies pour les corrections restent à enrichir. Nous avons démontré que l'AGF (Atmospheric Geogenic Fraction) était fortement influencée par le sol environnant : ainsi, il y a une formule de correction pour la plaine alluviale du Grésivaudan, une autre pour les sols de Belledonne, une autre encore pour le tunnel creusé dans la chaîne de sédiments argilo-calcaires de Lépine. L'importance quantitative de l'AGF dépend de la couverture végétale. La pratique agricole (sols nus, travaillés) augmente la contribution de l'AGF. Ce fait peut amener à considérer des apports typiquement géologiques comme dépendant de l'action humaine donc reliés à l'AAEF (ce que nous n'avons pas fait). Le choix de la formule de référence pour la fraction biogénique, en ce qui concerne les tissus du frêne, a une assez grande solidité grâce aux témoins cultivés en salle conditionnée.

Pour les dépôts, la situation est sans doute plus complexe : une analyse de la composition de la fraction organique est certainement nécessaire, entre humus, biomasse microbienne,

champignons et fractions végétales et animales. Une solution simple, sur le long terme, consiste probablement à accumuler des données sur des sites considérés comme non pollués par l'homme, et d'en comparer les résultats à une référence "salle conditionnée aux conditions strictement contrôlées". Nos expériences en salle conditionnée ont démontré que les apports par la voie de la sève xylémienne ne pouvaient d'aucune manière être négligés. Notre hypothèse est qu'une partie des éléments polluants présents dans le sol (Pb, Cr, V, Ni, Cu, As, Cd...) peuvent se retrouver dans la sève brute en quantités non négligeables, bien qu'ils ne fassent nullement l'objet d'un transport actif sélectif au niveau du symplasme racinaire. Ce fait peut amener à envisager un affinage des formules de référence qui nécessiterait sans doute une autre thèse pour le quantifier solidement.

Au total, nous disposons aujourd'hui d'un outil imparfait d'évaluation de l'AAEF. Avec un tel outil, les calculs montrent tous la présence d'un même ensemble d'éléments majoritaires dans l'AAEF. Celui-ci semble ainsi représentatif d'un niveau de pollution atmosphérique moyen pour une station. Dans le suber, la concentration au sein de l'AAEF de ces éléments préoccupants augmente dans des proportions différentes lorsqu'on passe de 1 à 40 ans d'âge pour les frênes étudiés. Ceci démontre ainsi clairement que le suber est un lieu d'accumulation de ces éléments à un pas de temps long. Ce fait est essentiel pour comprendre comment une telle structure apoplastique peut jouer le rôle d'archive atmosphérique.

Chapitre VII

Présence et distribution de particules solides dans les matrices étudiées

Sommaire

VII.1. Introduction.....	152
VII.2. Fondement des méthodes utilisables pour étudier les particules solides	152
VII.3. L'observation fondatrice sur des coupes transversales de tiges de frênes en PIXE	153
VII.4. Etude des coupes microscopiques en SEM-EDX	153
VII.5. Etude des cendres en SEM-EDX	159
VII.6. Etude SEM-EDX des 3 fractions (H ₂ O, HNO ₃ 2N et solide) issues du traitement des cendres de suber	162
VII.7. Analyse en ICP-MS des éléments présents dans les fractions C (H ₂ O), D (HNO ₃ 2N) et E (résidu solide)	172
VII.8. Discussion	174

VII.1. Introduction

On sait, par l'observation même des appareils de prélèvement des contenus atmosphériques basés sur la filtration, qu'une part essentielle de ce contenu est constituée de particules solides dont l'intérêt scientifique et l'impact biologique sont d'autant plus grands qu'elles sont plus fines. Ainsi, la loi sur l'air impose-t-elle actuellement une quantification de ces particules de taille $\leq 10 \mu\text{m}$ et de taille $\leq 2,5 \mu\text{m}$. Ces particules dans l'atmosphère échangent sans nul doute avec des structures plus complexes – des aérosols – et avec l'eau, à l'état de vapeur ou de gouttelettes de pluie, dans un contexte photochimique et thermique très complexe.

Notre objectif de compréhension du dépôt et de l'intégration des composants élémentaires atmosphériques sur et dans une matrice biologique vivante – l'arbre – à des pas de temps longs nécessite que l'on puisse cerner le rôle, la localisation et la persistance de ces particules dans cette matrice et au niveau de son interface avec l'atmosphère.

VII.2. Fondement des méthodes utilisables pour étudier les particules solides

Les analyses élémentaires plus ou moins complètes et de sensibilité élevée permettant de doser les éléments traces, comme l'ICP-MS, sont basées sur une mise en solution des éléments permettant de les concentrer et de les purifier par l'élimination de la matière organique. L'étude des particules elles-mêmes nécessite donc d'autres approches. Celles que nous avons développées se résument en 3 démarches complémentaires :

- 1) L'utilisation d'outils d'analyse élémentaire à l'échelle microscopique, sur très peu de matrice, permettant de visualiser des concentrations ponctuellement fortes d'un élément, au sein d'une matrice non dénaturée. Les méthodes PIXE et SEM-EDX correspondent à cette exigence. Pour une étude de coupe dans le matériel végétal, la microscopie à balayage offre une description microscopique détaillée de la structure anatomique et cytologique permettant une localisation précise des particules vues ensuite par EDX.
- 2) L'incinération contrôlée des matrices analysées permet d'éliminer la matière organique qui est en général leur constituant majeur, et transforme les sels thermo-instables en oxydes. Le mélange obtenu est très riche en K et Ca.

- 3) La dissolution fractionnée des cendres permet de les séparer en 3 phases : a) hydrosoluble ; b) soluble instantanément dans HNO_3 2N à froid ; c) solide résiduelle. Chacune des phases sera étudiée en ICP-MS et en SEM-EDX.

VII.3. L'observation fondatrice sur des coupes transversales de tiges de frênes en PIXE

La **Figure 7.1** est obtenue par PIXE et visualisation des concentrations en fausses couleurs, sur une coupe transversale de tige de frêne de 4 ans. Chaque pixel représente une surface de $1\ \mu\text{m}^2$ correspondant à la taille du faisceau de protons (Cf matériel et méthodes). Du signal est obtenu pour le fer, le zinc et le manganèse (trois éléments présents dans ces tiges à des concentrations allant de 50 à $500\ \mu\text{g.g}^{-1}$). On observe dans la seule zone subérienne des accumulations ponctuelles très fortes du fer et du zinc qui suggèrent qu'elles correspondent à des particules solides. Pour le Mn, la situation est moins tranchée. On observe au centre, une structure sans doute particulière. Mn se distribue, par ailleurs d'une autre manière diffuse, suggérant plutôt une adsorption sur les parois cellulaires.

VII.4. Etude des coupes microscopiques en SEM-EDX

VII.4.1. L'observation SEM (Scanning Electron Microscope)

Le SEM produit des images de la morphologie des surfaces et des plans de coupe avec un pouvoir séparateur bien inférieur au μm , qui permet une excellente localisation cytologique avec les parois, les grains d'amidon, les cribles... dans le végétal, et des capacités d'identification des fractions biologiques dans les dépôts de surface.

La **Figure 7.2** illustre ces faits avec une image SEM de coupe transversale de tige.

VII.4.2. L'utilisation de l'EDX (Energy-Dispersive X-ray)

L'exploration d'une surface importante ($300 \times 200\ \mu\text{m}$) permet d'obtenir un spectre élémentaire montrant les quantités relatives des différents éléments discernés. Le spectre qui en résulte est appelé "spectre global", on en a un exemple dans la **Figure 7.3**.

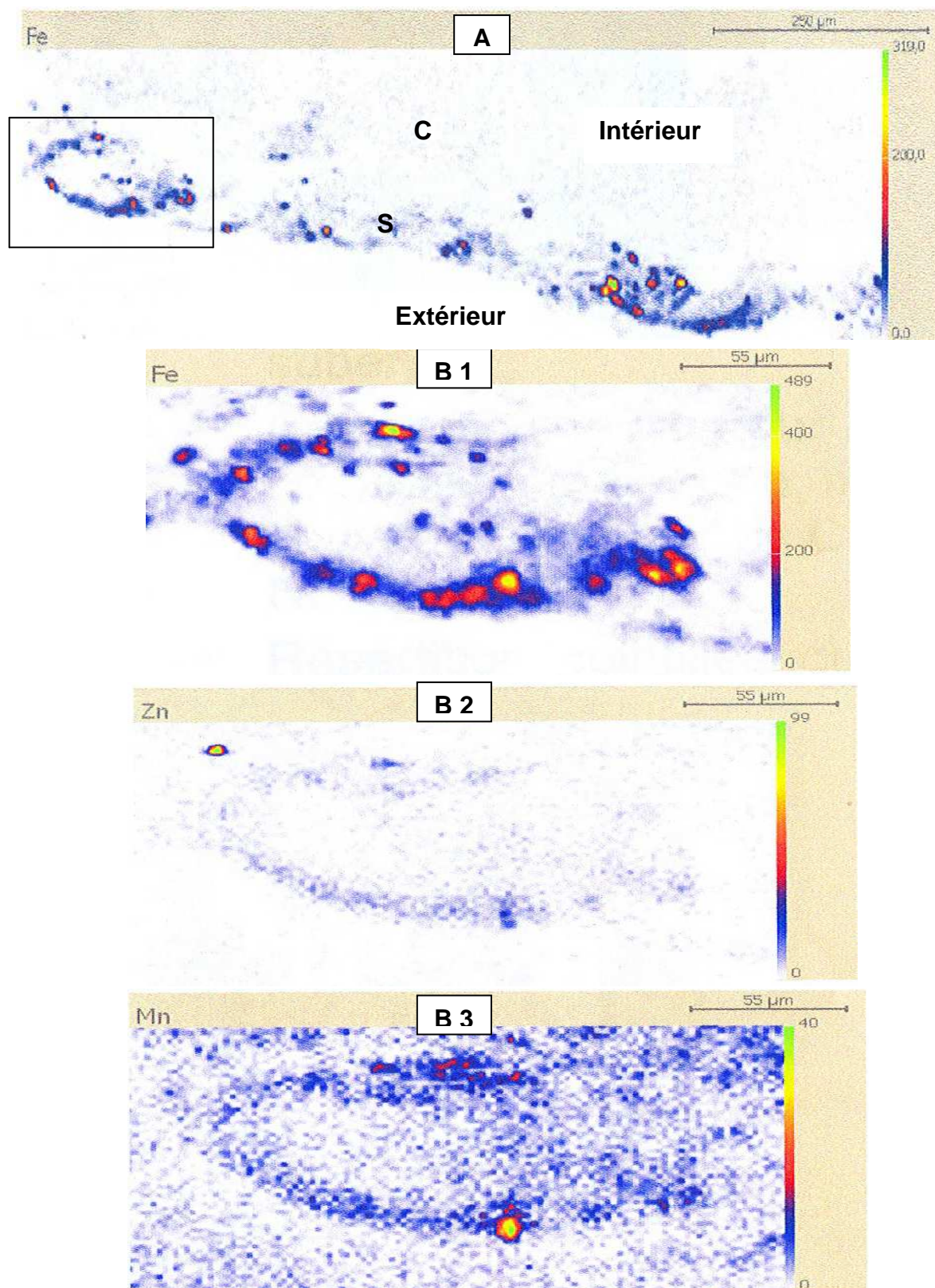


Figure 7.1 : Images PIXE montrant la présence de particules solides et la distribution de Fe, Zn et Mn sur une coupe transversale de suber de *Fraxinus excelsior* L. de 4 ans. L'encadré noir sur l'image A montre la région analysée pour obtenir la série d'images B. les échelles de couleur sont arbitraires et varient selon l'élément. Le niveau de couleur représente le nombre de coups total par pixel dans la région d'intérêt du spectre des rayons X.

S : suber, C : collenchyme.

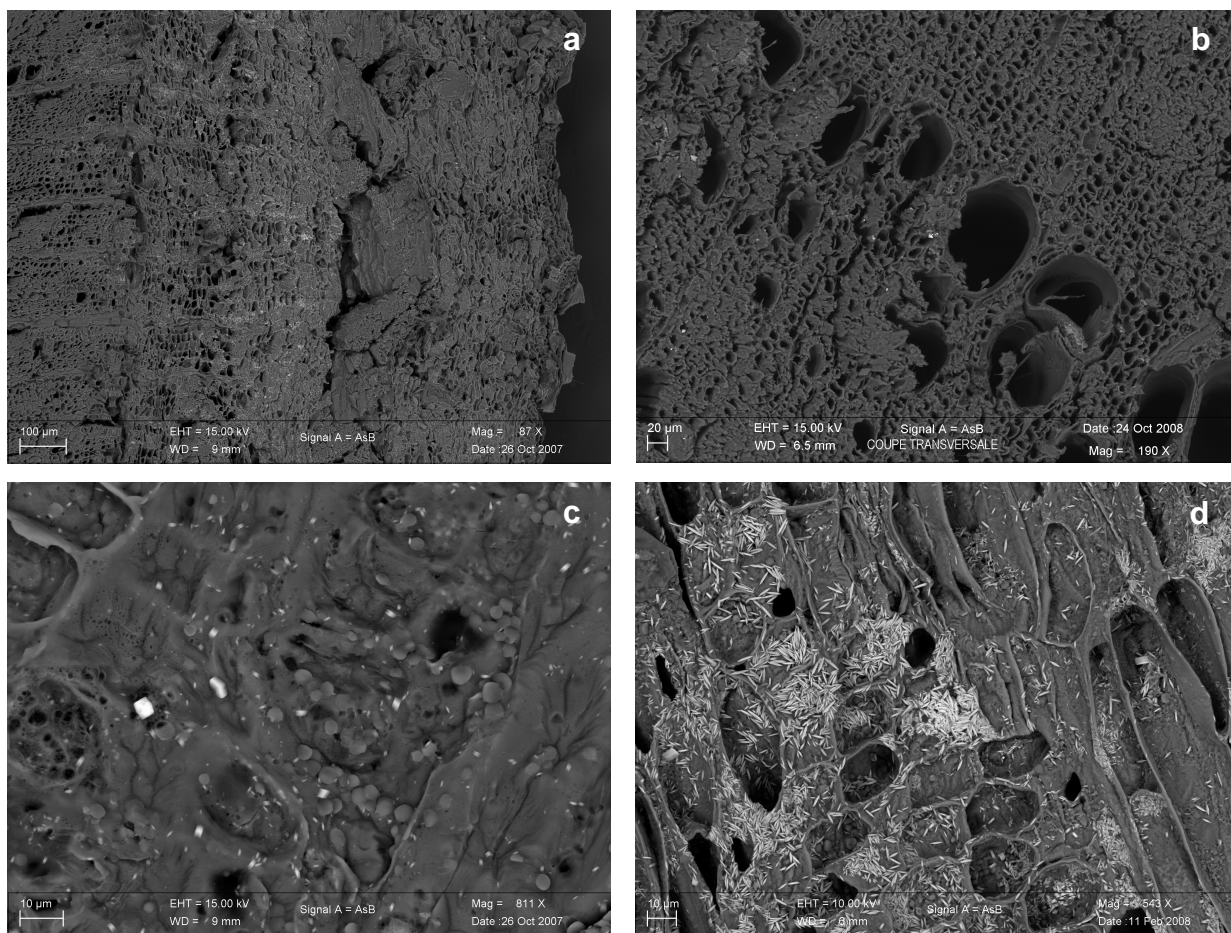


Figure 7.2 : Clichés SEM sur des coupes de tige de frêne de 4 ans. a) vue d'ensemble d'une coupe transversale (grossissement $\times 87$), b) vue d'une coupe transversale au niveau du bois (grossissement $\times 190$), c) vue d'une coupe longitudinale au niveau du phloème (montrant inclusions minérales et amidon) (grossissement $\times 811$), d) vue d'une coupe transversale au niveau du phloème montrant l'énorme stock de cristaux organo-calciques (grossissement $\times 543$).

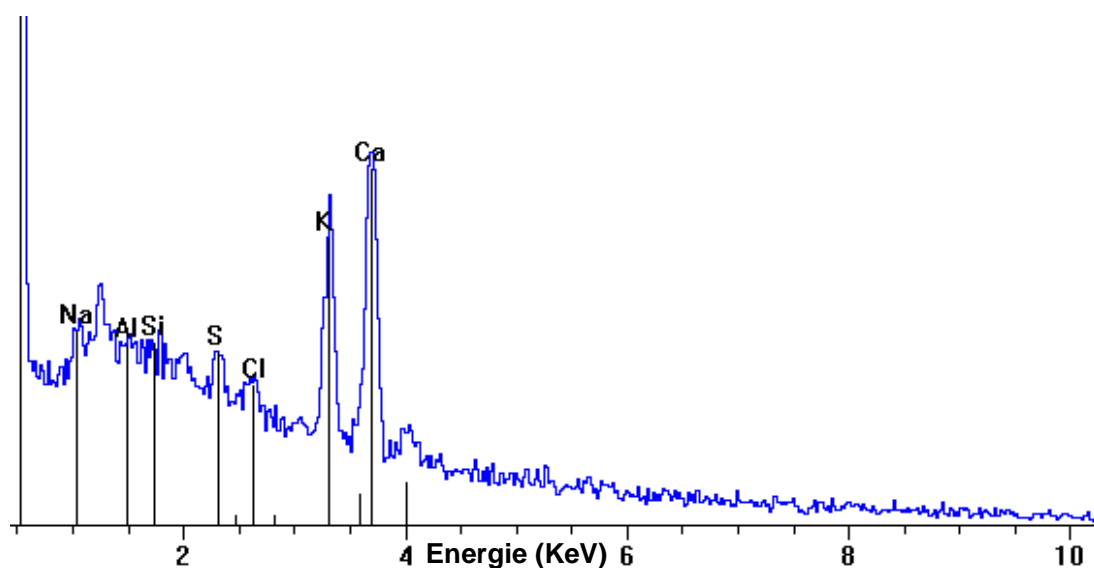


Figure 7.3 : Spectre élémentaire global par SEM-EDX d'une coupe tangentielle de tige de frêne dans la zone subérienne

Le spectre est théoriquement comparable (sans préjuger de la sensibilité du signal) au résultat d'une analyse en ICP-MS (qui est, cependant, basée sur 100 à 1000 fois plus de matériel).

A une échelle plus fine, on peut concentrer l'observation sur des tissus bien définis, et observer des particules métalliques distinguées du fond organique sombre par leur luminosité qui est fonction de la masse atomique de l'élément considéré (**Figure 7.4**). On constate sur des coupes de tige de frêne que ces spots lumineux se limitent au suber. A un grossissement plus fort, on peut réaliser l'analyse EDX sur ces spots lumineux séparément de manière à établir leur composition élémentaire.

Sur la **Figure 7.5**, on a réalisé l'analyse de 16 de ces spots, choisis en raison d'une taille suffisante (≥ 1 à $2 \mu\text{m}$) pour que leur spectre élémentaire ne soit pas pollué par leur environnement.

Le **Tableau 7.1** mentionne la composition élémentaire de chaque particule, établie grâce au spectre EDX et propose un classement (non catégorique) par origine.

Tableau 7.1 : Composition de 16 particules choisies dans la figure 5.5 et proposition de leur origine

Géogénique		Susceptibles d'être d'origine anthropique		Susceptibles d'être d'origine biologique	
N°	Contenu élémentaire	N°	Contenu élémentaire	N°	Contenu élémentaire
2	Si, Al	1	Al	13	Ca
3	Si, Mg, Fe	4	Pb		
11	Si	5	Al, F, Ca		
		6	Al, F, Ca		
		9	Al, F, Ca		
		10	Al, F, Ca		
		12	Al, F, Ca		
		14	Al, F, Ca		
		16	Al, F, Ca		
		7	Al, Ca		
		8	Fe, Cl		
		15	Fe, Ni, Cu		

La **Figure 7.6** montre le spectre EDX de 3 de ces particules. La particule n°3 est constituée d'un silicate de magnésium et de fer caractéristique d'une origine géogénique. La particule n°8 est constituée de fer pur dont au moins une partie sous forme d'oxyde. Elle peut avoir une origine industrielle. La particule 13 est du calcium pur dont l'origine est douteuse, peut être géogénique, ou encore biologique, par recristallisation du calcium interne au cours de la dessiccation de la coupe. Cette dernière hypothèse plaiderait en faveur du nitrate de calcium et non de calcium pur.

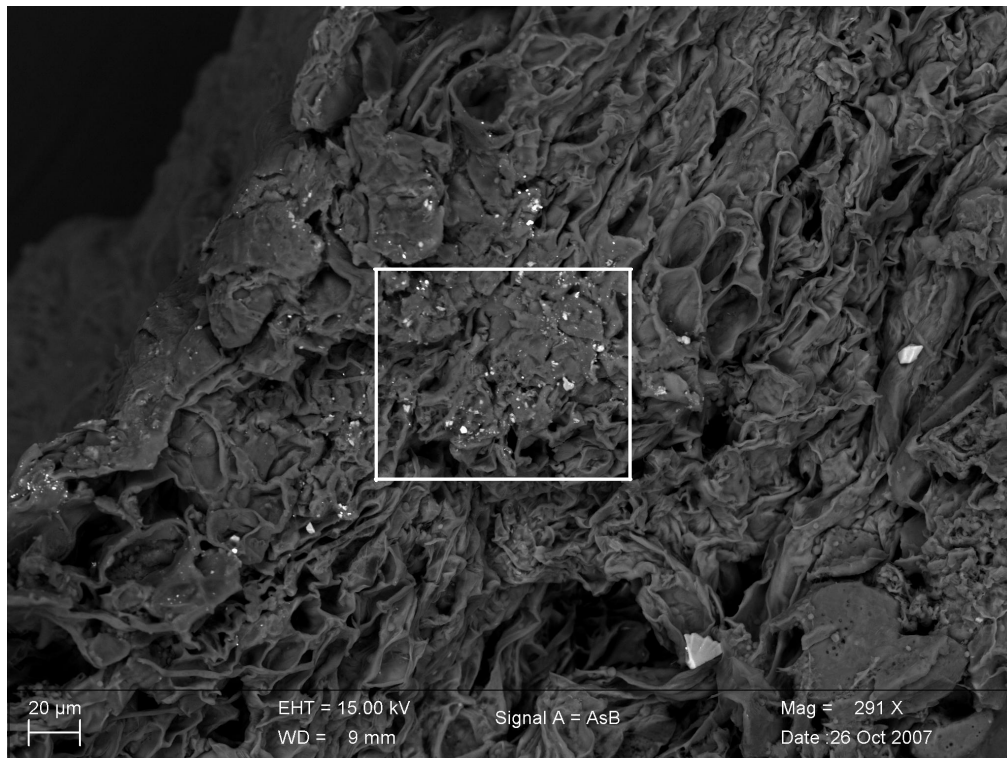


Figure 7.4 : Image SEM-EDX (400 × 300 µm) d'une coupe transversale dans un suber lavé d'une tige de frêne de 4 ans (grossissement × 291).

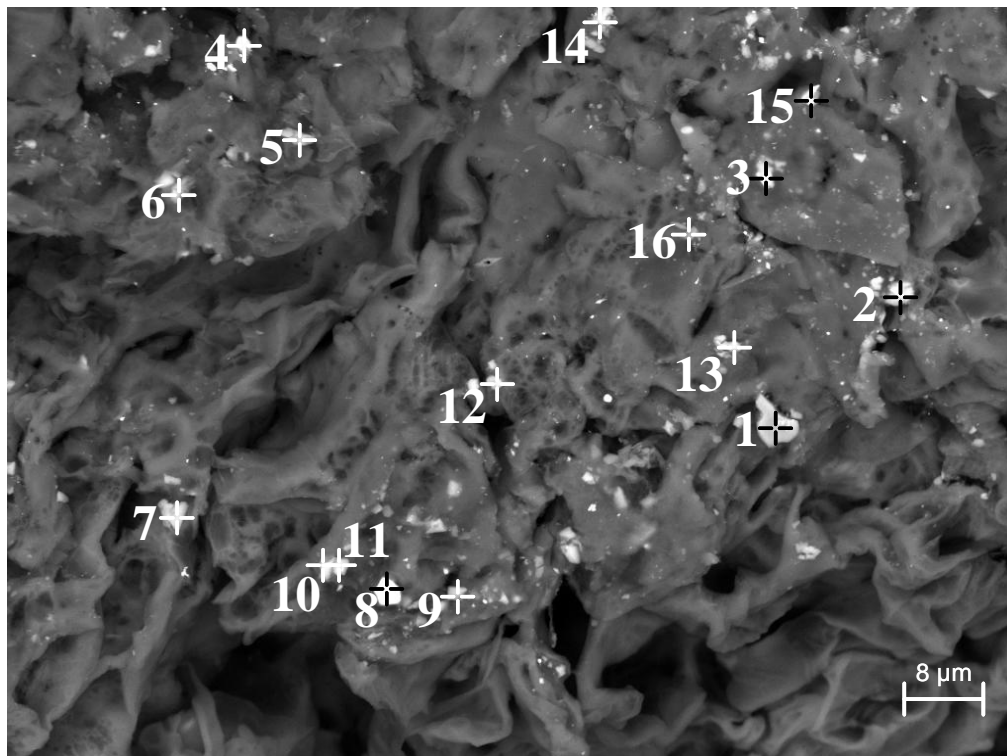


Figure 7.5 : Choix de 16 particules minérales dans le rectangle 100 × 80 µm montré dans la Figure 7.4 (grossissement × 1164).

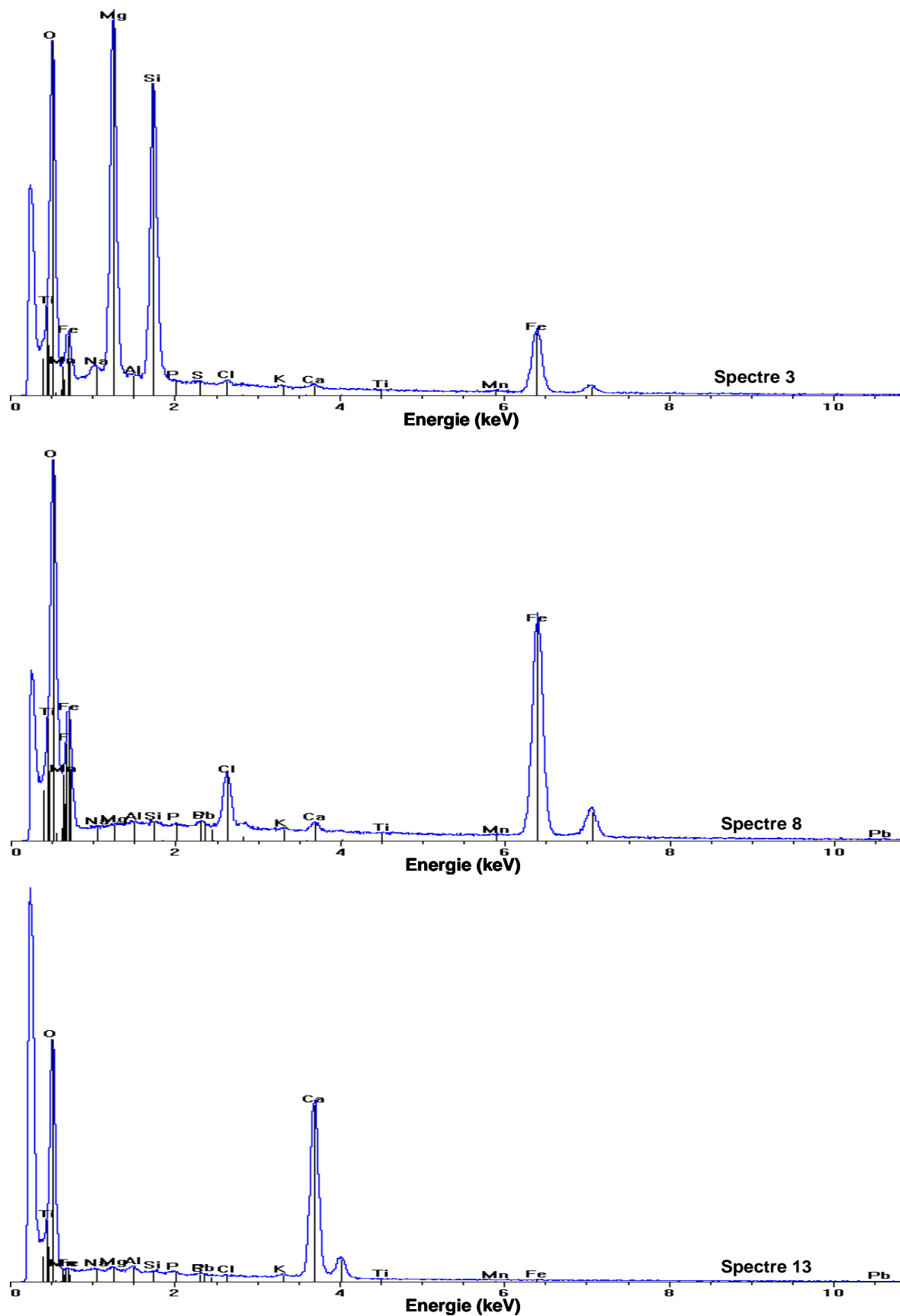


Figure 7.6 : Spectres d'émission de rayons X de 3 particules intégrées analysées par SEM-EDX dans la coupe au niveau du suber (indiqués par les nombres dans la figure 7.5).

VII.4.3. L'étude EDX de la distribution interne des particules

On a vu sur toutes les coupes transversales observées que les particules se limitaient à la zone subérienne et étaient totalement absentes (hormis le calcium) dans les autres tissus (collenchyme, liber, bois). Ce résultat est évidemment de grande importance pour faire un usage bioindicateur cohérent des tiges d'arbre pour la pollution atmosphérique. Nous avons alors tenté une observation, non de coupes transversales dans le suber, mais de la surface externe du suber d'une part et de sa surface interne séparée par déchirement du parenchyme, d'autre part (**Figure 7.7**).

D'une manière globale, les observations SEM-EDX démontrent que les particules solides sont principalement situées dans la partie extérieure du suber. Aucune différence quantitative claire n'a pu être vue dans la composition du mélange élémentaire entre les deux faces.

VII.5. Etude des cendres en SEM-EDX

Plusieurs essais comparatifs ont montré qu'une incinération progressive à 550°C (Harju *et al.*, 2002 ; Saarela *et al.*, 2000 et 2005 ; Reimann *et al.*, 2008 ; Catinon *et al.*, 2009) ne modifie pas de manière significative la composition du mélange en éléments traces. L'incinération entraîne principalement une perte sélective de C, H, O, N, et probablement en partie du soufre. La **Figure 7.8** montre le spectre global d'émission de rayons X de ces cendres.

Les éléments qui possèdent un pic caractéristique sont Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, K et Ca, avec une dominance du pic de K. Cela est dû au fait que K^+ est largement distribué dans la matière organique de manière diffuse et ne donnant ainsi que peu de signal EDX dans la matrice non incinérée. Il prend la forme de K_2O cristallisé dans les cendres. Na, Mg, P, S et Cl sont susceptibles d'être majoritairement d'origine biologique, via l'absorption racinaire. La silice est l'élément le plus caractéristique d'une origine géogénique. Son pic est cependant très faible dans le spectre global des cendres. Des éléments comme le fer ne sont pas perçus dans un tel spectre. Il en est de même de tout le mélange des éléments traces qui est l'objet de notre étude (Zn, Cu, Pb, Cr, Ni, Cd, As...). Le spectre global des cendres est dominé par les éléments biologiques.

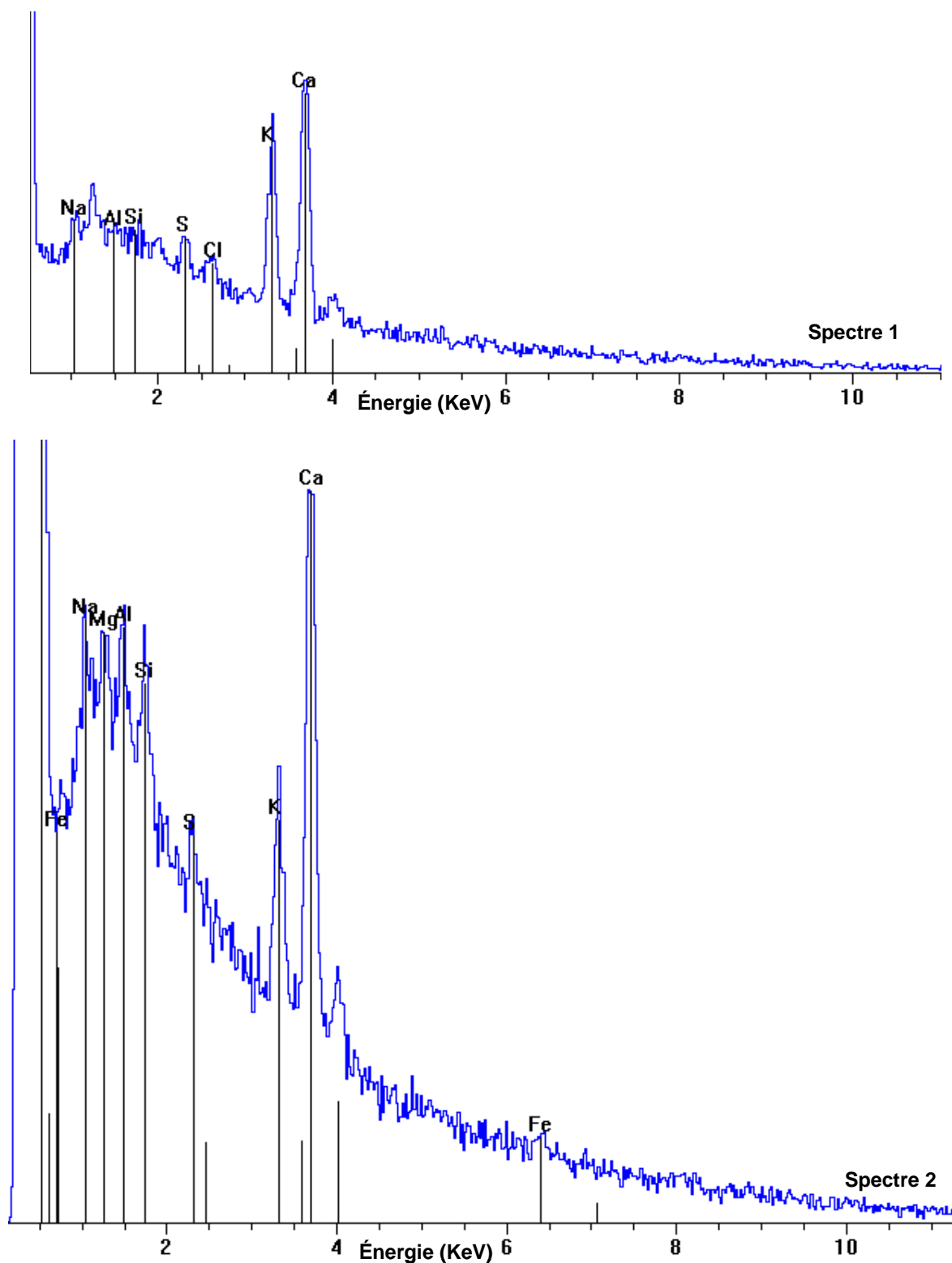


Figure 7.7 : Spectres globaux d'émission de rayon X de la face interne (Spectre 1) et de la face externe (Spectre 2) de coupes tangentielles.

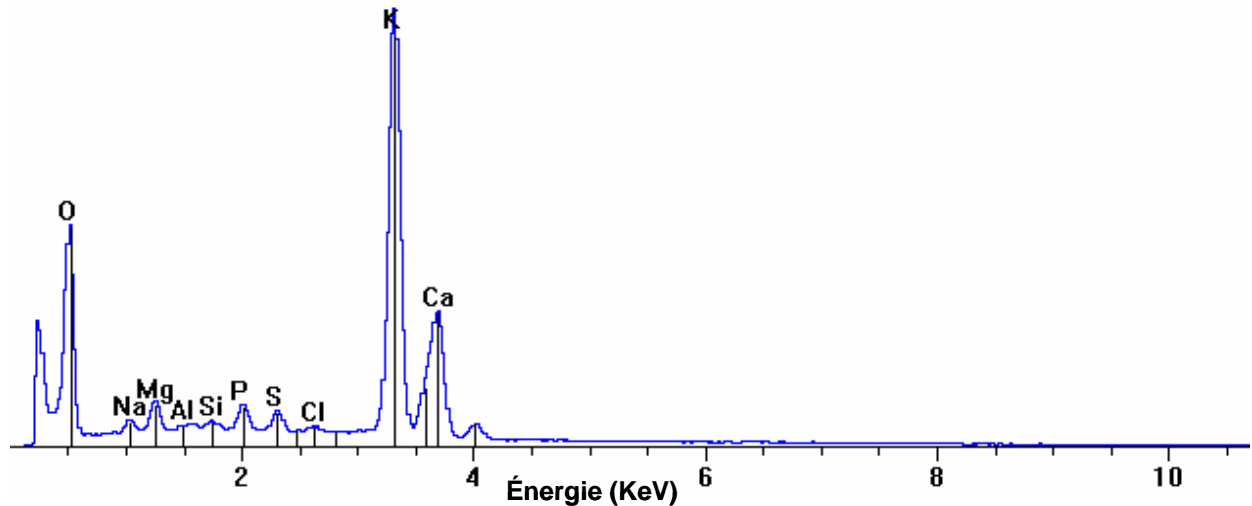


Figure 7.8 : Spectre d'émission global des cendres de suber

L'observation SEM-EDX sur les cendres nous permet de voir des particules solides lumineuses, mais cette observation est rendue très difficile en raison de l'énorme quantité de Ca et de K. Nous avons donc décidé de tenter de purifier les particules solides présentes dans les cendres. Le principe de ce fractionnement est résumé dans la **Figure 7.9**.

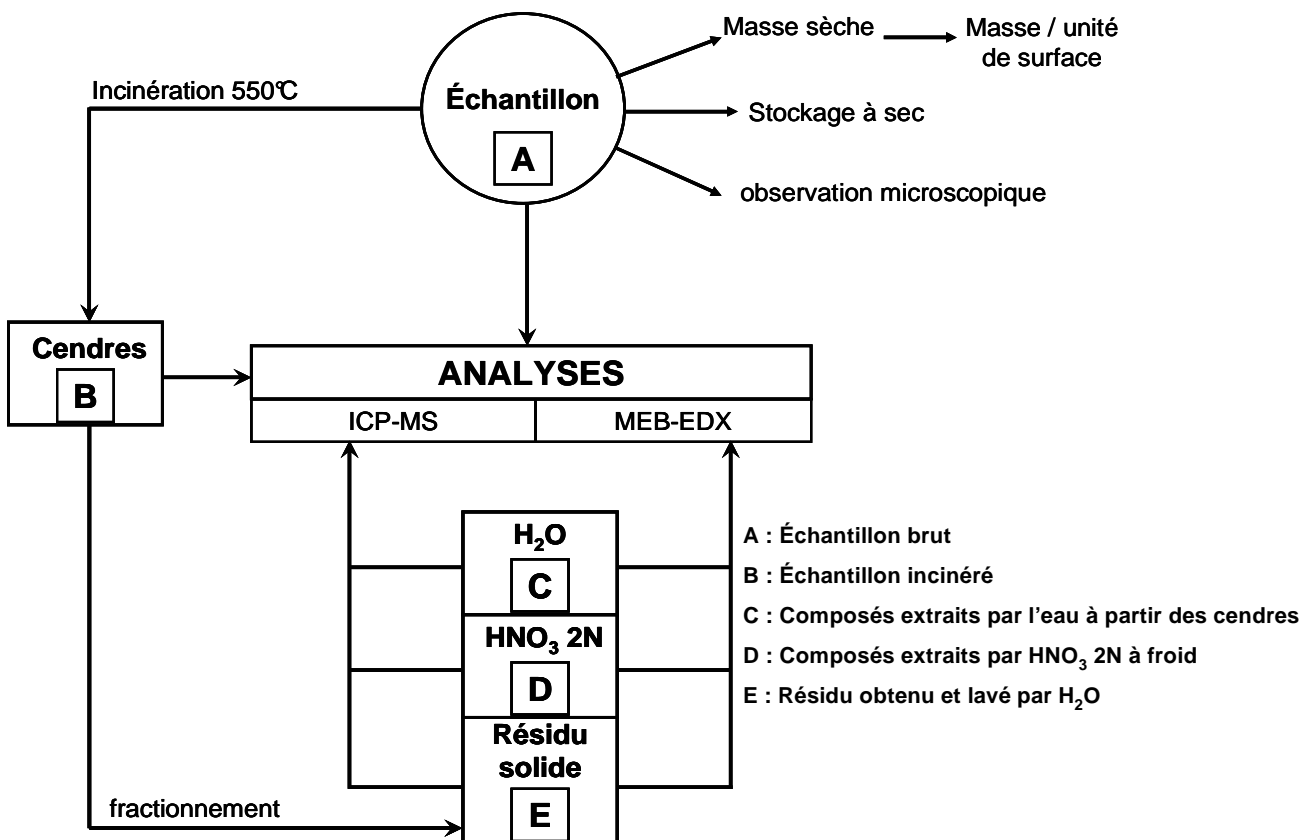


Figure 7.9 : Schéma explicatif des différentes étapes de la procédure de fractionnement en vue de l'isolement des particules solides

L'échantillon A incinéré donne la fraction de cendres B. Celle-ci est extraite par l'eau (fraction C) ; puis le résidu solide est traité par HNO_3 2N à froid durant 15 min, ce qui donne la solution D et le résidu insoluble E.

VII.6. Etude SEM-EDX des 3 fractions (H_2O , HNO_3 2N et solide) issues du traitement des cendres de suber

VII.6.1. La phase solide

La masse sèche du culot obtenu par le traitement acide atteint environ 1% de la masse initiale des cendres. La photo SEM-EDX de ce culot est illustrée par la **Figure 7.10**. Il est composé d'un mélange de particules de tailles et de couleurs différentes.

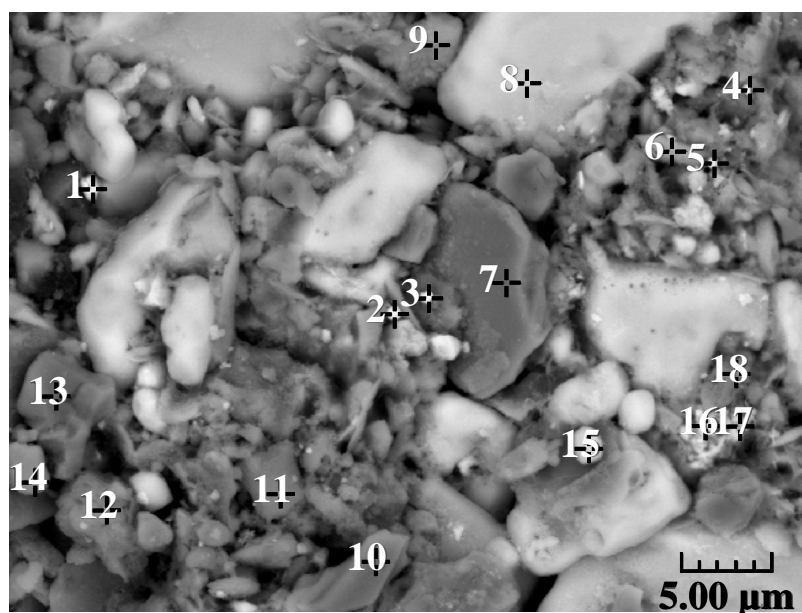


Figure 7.10 : Image SEM-EDX du mélange de particules solides qui sont présentes dans le résidu des cendres de suber après traitement à l'acide chlorhydrique.

Ce culot est dominé par les éléments d'origine géogénique, comme le montre la **Figure 7.11**. Les spectres 3, 7 et 16 sont des silicates. Pour le seul cristal n°7 dont la grande taille garantit qu'elle contient intégralement la surface impactée par le faisceau, on a la garantie de l'absence de contamination par d'autres composés. C'est un silicate d'aluminium et de potassium. La particule 16 regroupe sans doute plusieurs composés, avec beaucoup de silice, de chlore, de calcium, de titane et de fer. On peut supposer la superposition de CaCl_2 avec un silicate de fer et de potassium, plus du titane. La particule 3 regroupe Si, Al, Mg, Fe et K.

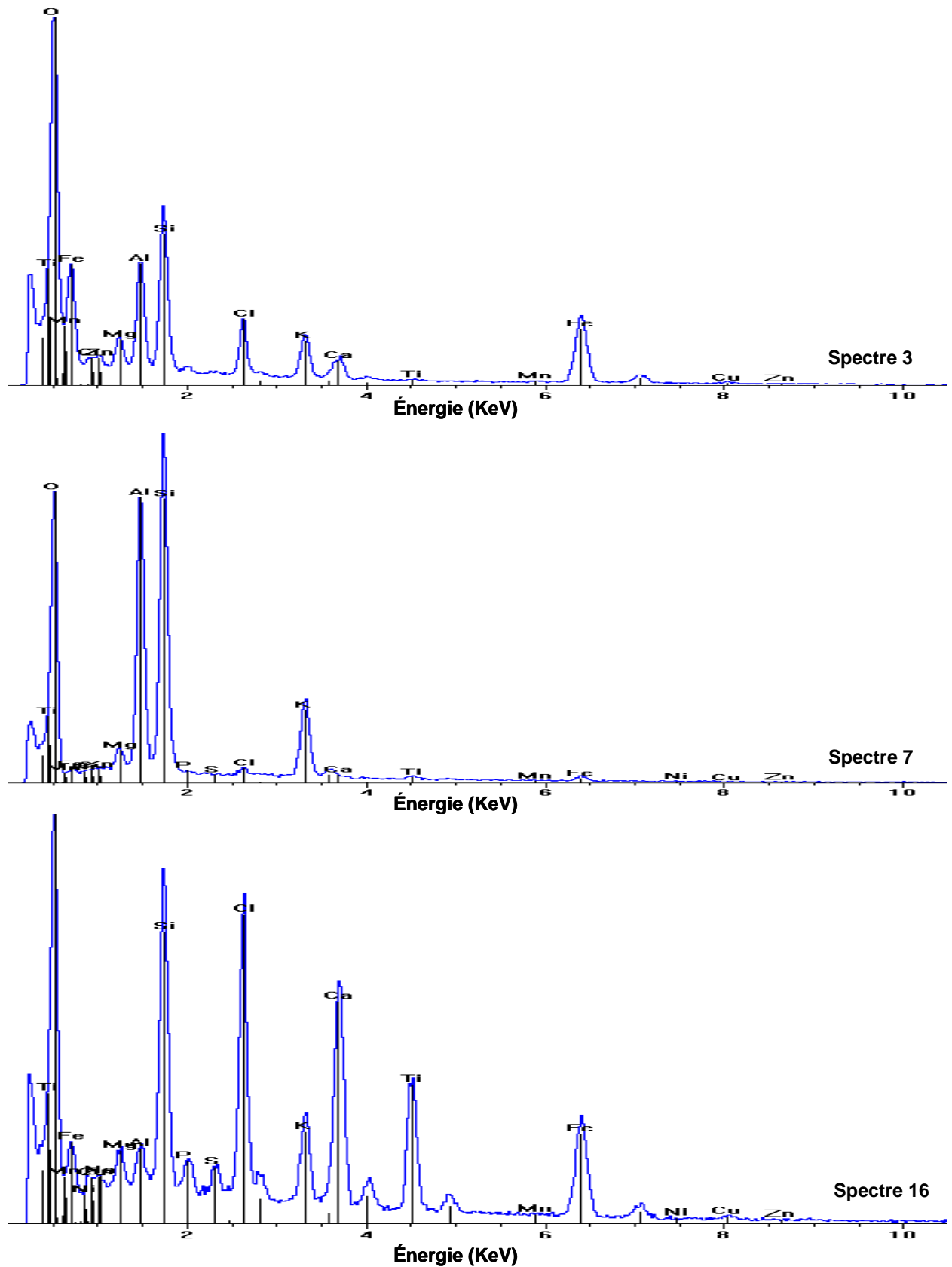


Figure 7.11 : Spectres d'émission de rayon X de 3 particules analysées par SEM-EDX (indiquées par les numéros de la Figure 7.10).

Une étude plus complète de cette phase solide fait apparaître de nombreux éléments traces variés. Le spectre EDX global de cette phase (**Figure 7.12**) montre la présence des éléments traces détectés.

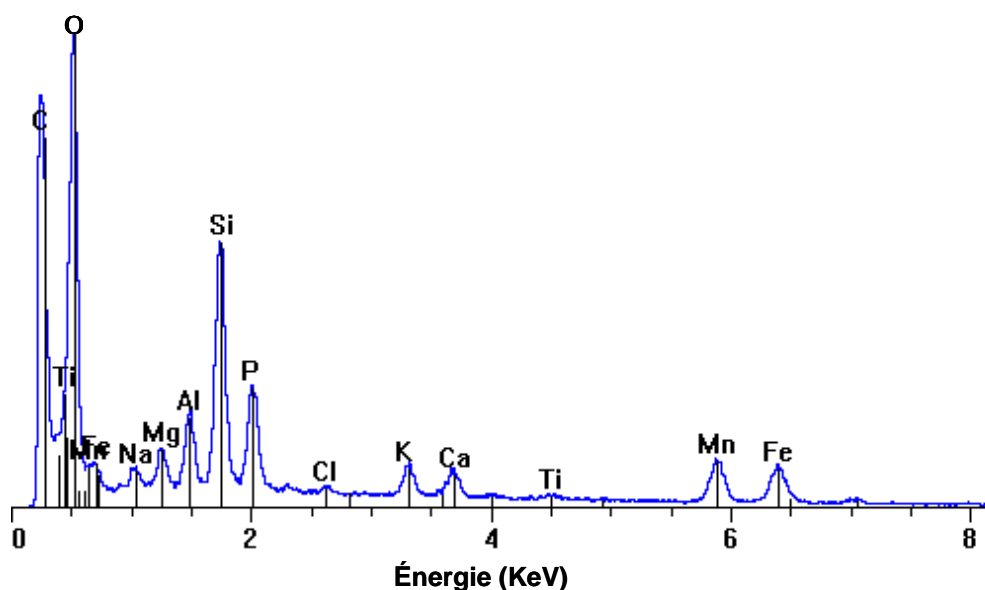


Figure 7.12 : Spectre d'émission global de la phase solide obtenue après fractionnement de cendres de suber

Ce spectre fait apparaître 7 éléments majeurs : Si (55%), Al (12,3%), P (11%), Ca (9,3%), Fe (4,7%), K (3,3%), Mg (2,0%) et Na (1,7%). Ce spectre diffère totalement de celui des cendres de suber ou du suber intact dominées par K et Ca. Il est majoritairement caractéristique de la présence de composés géogéniques (Si, Al, Na, Fe, Mg).

Par ailleurs, cette exploration de la phase solide va faire découvrir, en faible abondance, des structures sphériques caractéristiques d'une production anthropique liée à des températures élevées, les cendres volantes (ou fly ashes). Nous en avons détecté qui étaient constituées soit d'aluminium, de fer, de nickel-chrome, de zirconium ou de silice (**Figures 7.13a, 7.13b et 7.14**).

La **Figure 7.14** montre différents types de cendres volantes rencontrées dans notre matériel. La résistance de la fraction E à une dissolution plus poussée par HNO₃ concentré, sur un temps long a été analysée (HNO₃ 10N, une semaine). Ca et P disparaissent au cours de ce traitement, suggérant que ces éléments constituaient du Ca₃(PO₄)₂ dans la fraction E où il a effectivement été détecté sous forme cristalline par SEM-EDX. Tous les autres éléments de E se maintiennent dans le culot et ne sont pas solubilisés après un traitement d'une semaine avec HNO₃ 10N.

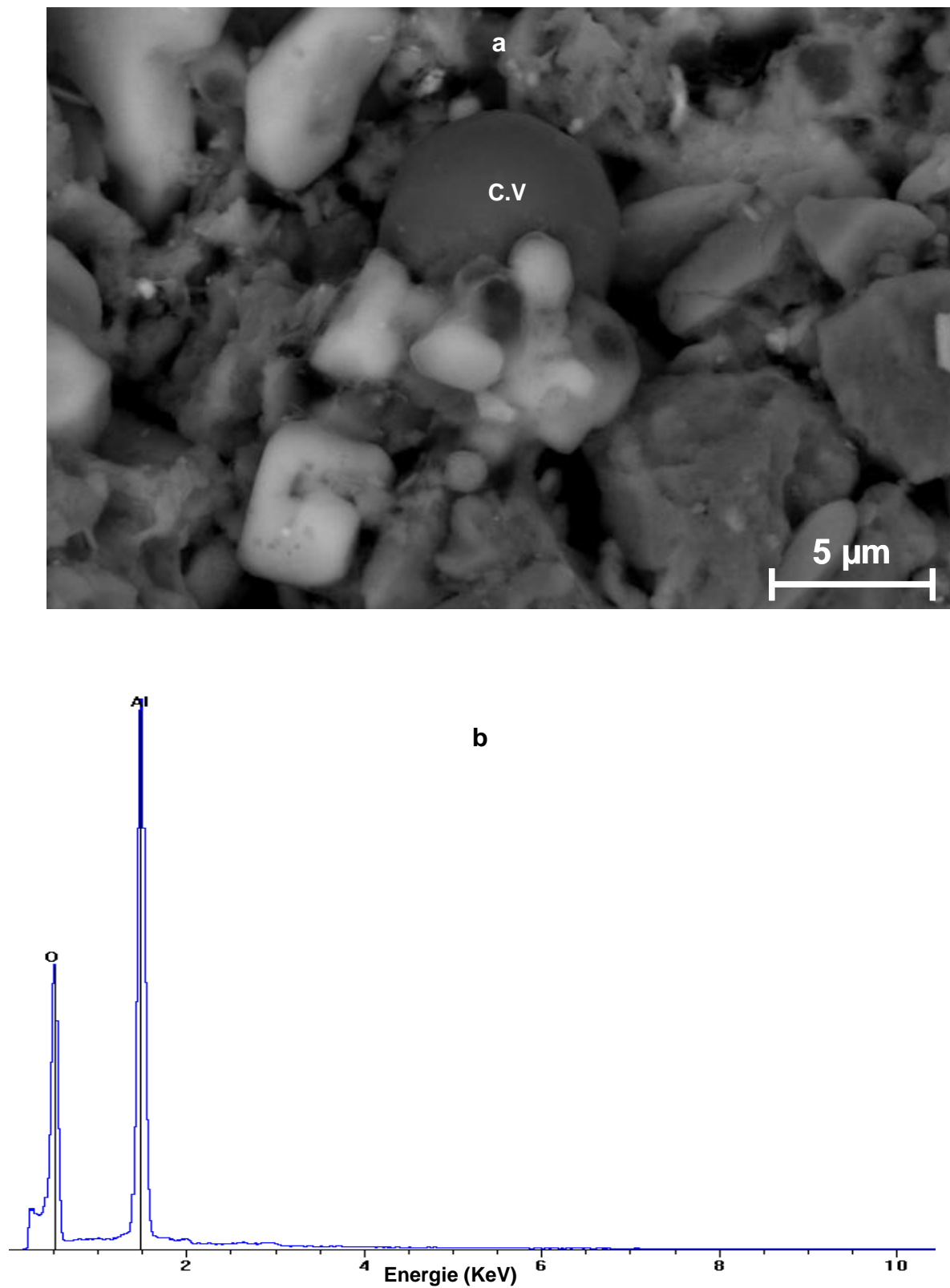
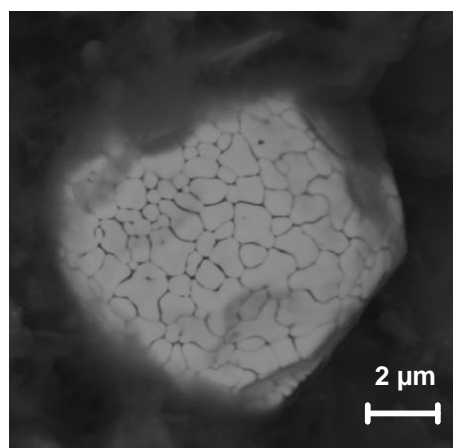
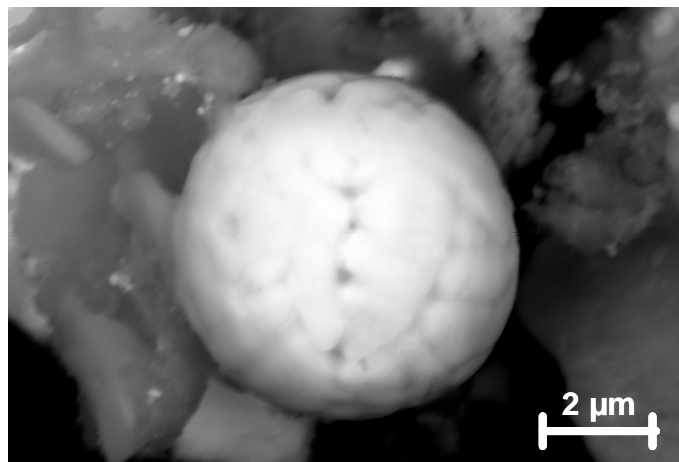


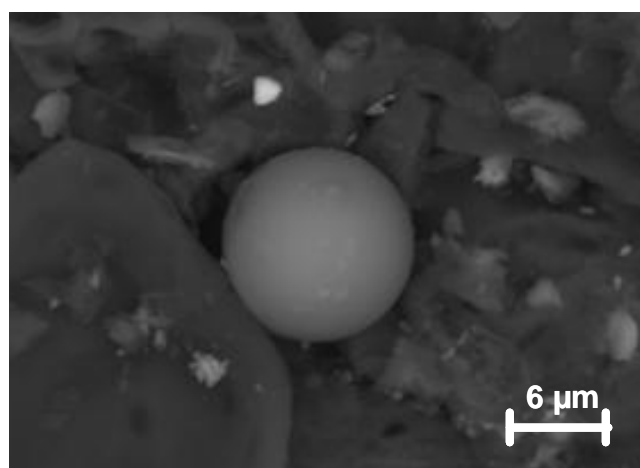
Figure 7.13 : a) Image SEM d'une cendre volante d'aluminium (marquée "C.V" sur la photo) dans le culot des cendres traitées à HNO_3 2N. b) Spectre d'émission des rayons X de la cendre volante analysée par SEM-EDX (Figure 7.13a)



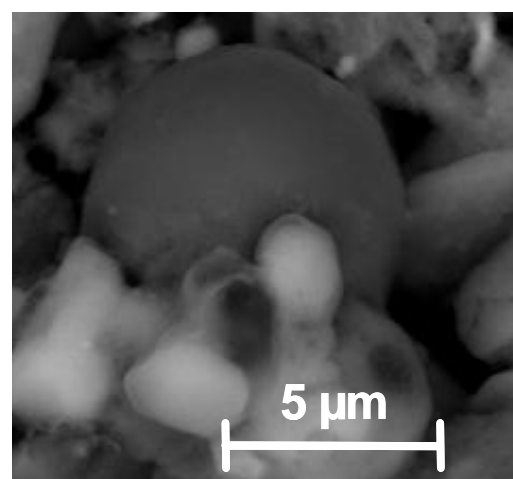
Nickel-Chrome



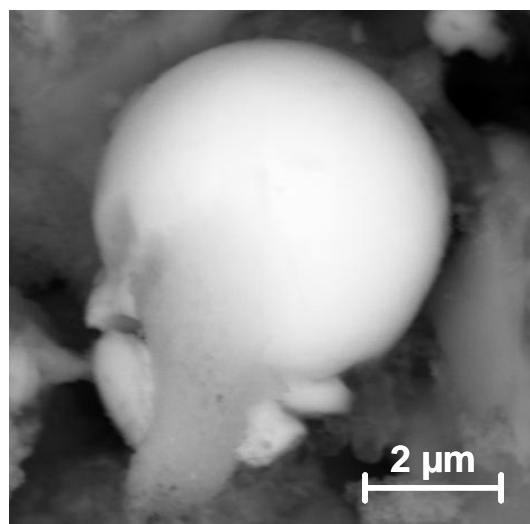
Fer



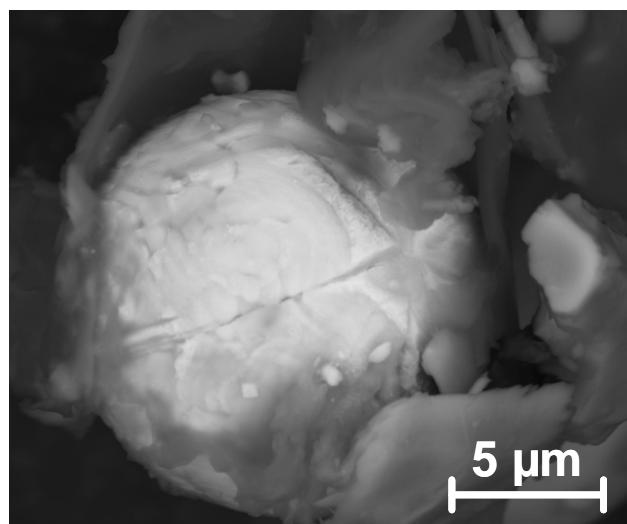
Silice



Aluminium



Zirconium



Fer

Figure 7.14 : Observation en microscopie électronique à balayage de cendres volantes présentes dans le dépôt de surface et dans l'écorce superficielle.

Le phosphate tricalcique a pu se former en cours d'incinération, à partir de constituants biogéniques ou provenir du sol (origine géogénique ou agricole).

La distribution de 8 éléments suffisamment représentés a été étudiée par SEM-EDX dans la fraction E (Si, Al, Fe, Na, Mg, S, Ti, Cr) (**Figure 7.15**).

L'aspect morphologique de la préparation est indiqué par l'image SEM située en haut à gauche de la **figure 7.15**. Il ne semble pas exister de relation claire entre la présence de particules (image SEM) et la détection d'éléments montré par un SEM-EDX sélectif. Parmi les huit éléments étudiés, la silice est l'élément le plus uniformément réparti et abondant. Na, Fe et S sont également très répandus. Bien que Na ne puisse pas être présent sous une forme libre, son association avec la silice semble peu probable. Certaines grosses particules dans l'image SEM ont le même emplacement que des spots de Fe.

Quelques rares petits spots d'Al, Mg, Ti ou Cr sont présents, mais sans distribution commune. Un fond d'aluminium de couleur terne peut être observé et pourrait être associé à la silice, association déjà vue précédemment dans plusieurs spectres (**Figure 7.11**).

La taille des particules constitutives de la fraction E a été mesurée parallèlement sur le contenu subérien et sur le dépôt de surface (750 particules mesurées pour le suber et 1850 pour le dépôt de surface) (**Figures 7.16a et b**).

Dans le suber, 30% des particules ont une taille inférieure ou égale à $1\mu\text{m}$, 95% des particules ont une taille inférieure à $10\mu\text{m}$. Quelques rares particules atteignent une taille proche de $50\mu\text{m}$. Les particules très fines ($\leq 1\mu\text{m}$) sont encore plus abondantes dans le dépôt de surface (**Figure 7.16b**).

VII.6.2. Fraction D (HNO_3 2N)

L'étude SEM-EDX de la fraction D fait apparaître un mélange de cristaux formés au cours de la dessiccation de cette fraction où $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ est très majoritaire. Dans le spectre EDX, on distingue la présence en quantité notoire de Mg, P et K qui pourraient représenter des phosphates de Mg et K, formés pendant l'incinération et non transformés par HNO_3 en nitrates (**Figures 7.17a et b**).

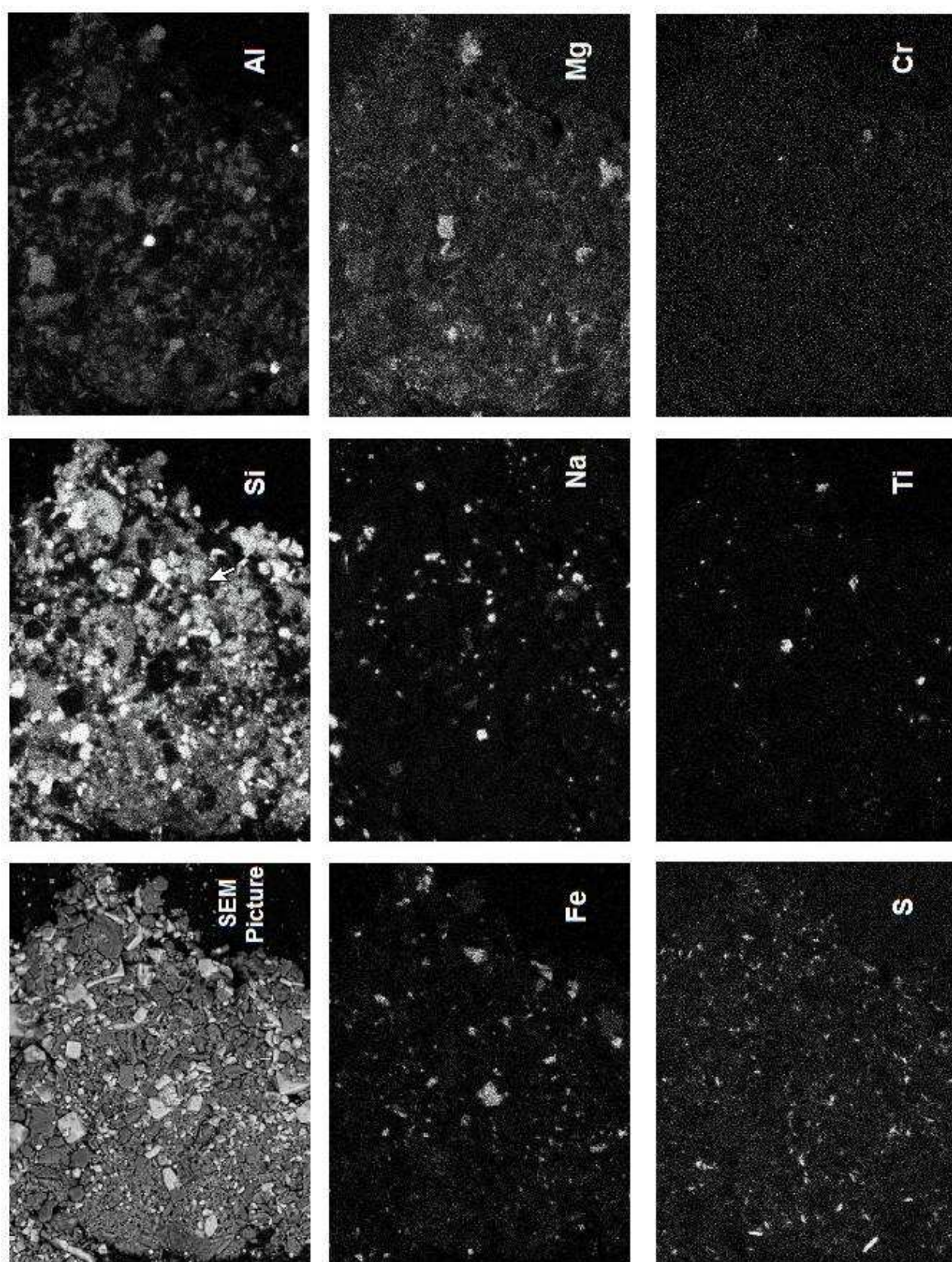


Figure 7.15 : Identification par SEM-EDX de la distribution de 8 éléments (Si, Al, Fe, Na, Mg, S, Ti et Cr) dans le résidu solide obtenu après traitement à HCl 2N.

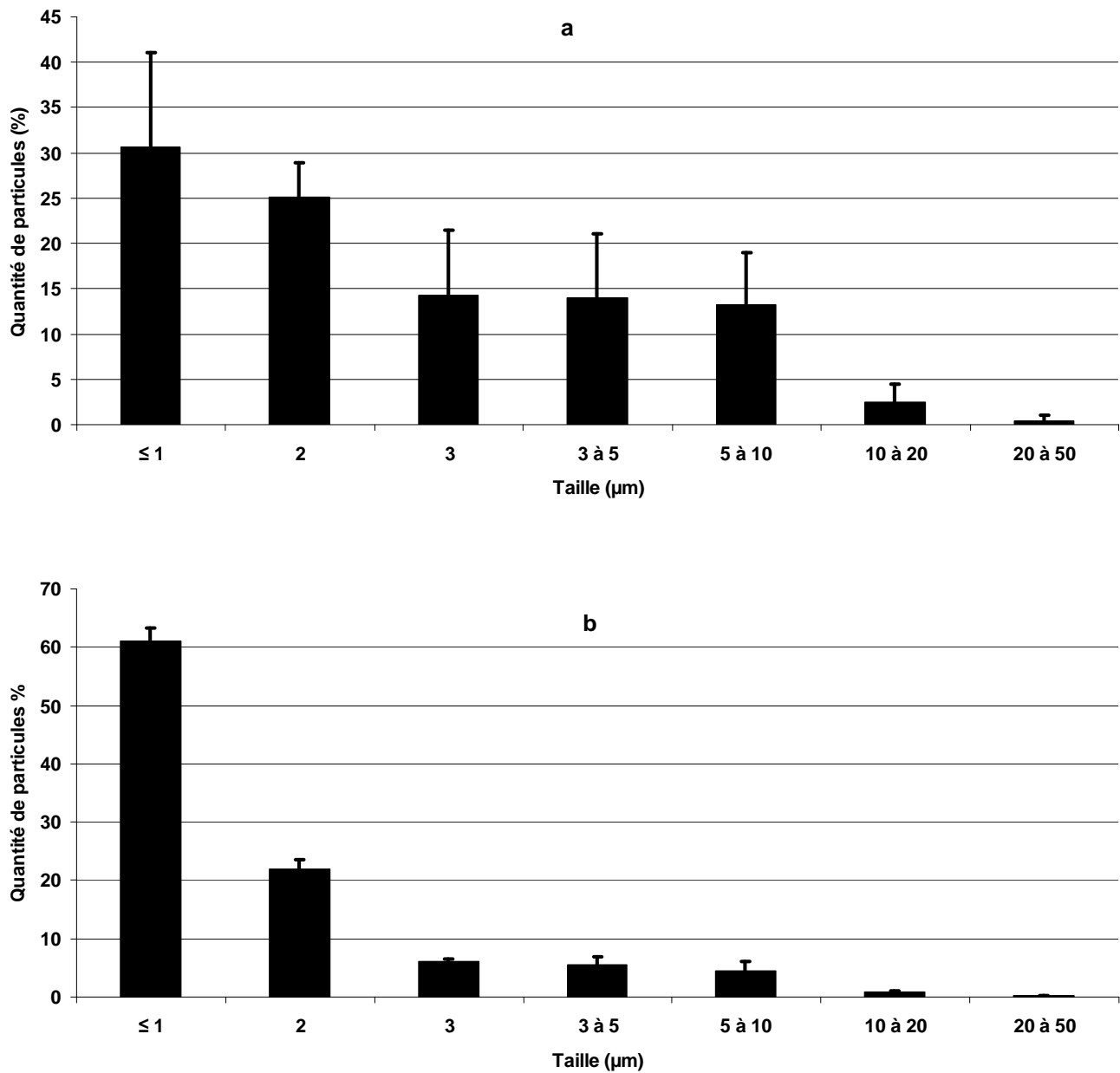


Figure 7.16 : Distribution des particules suivant leur taille dans le culot E après traitement acide des cendres de suber (a) ou du dépôt de surface (b)

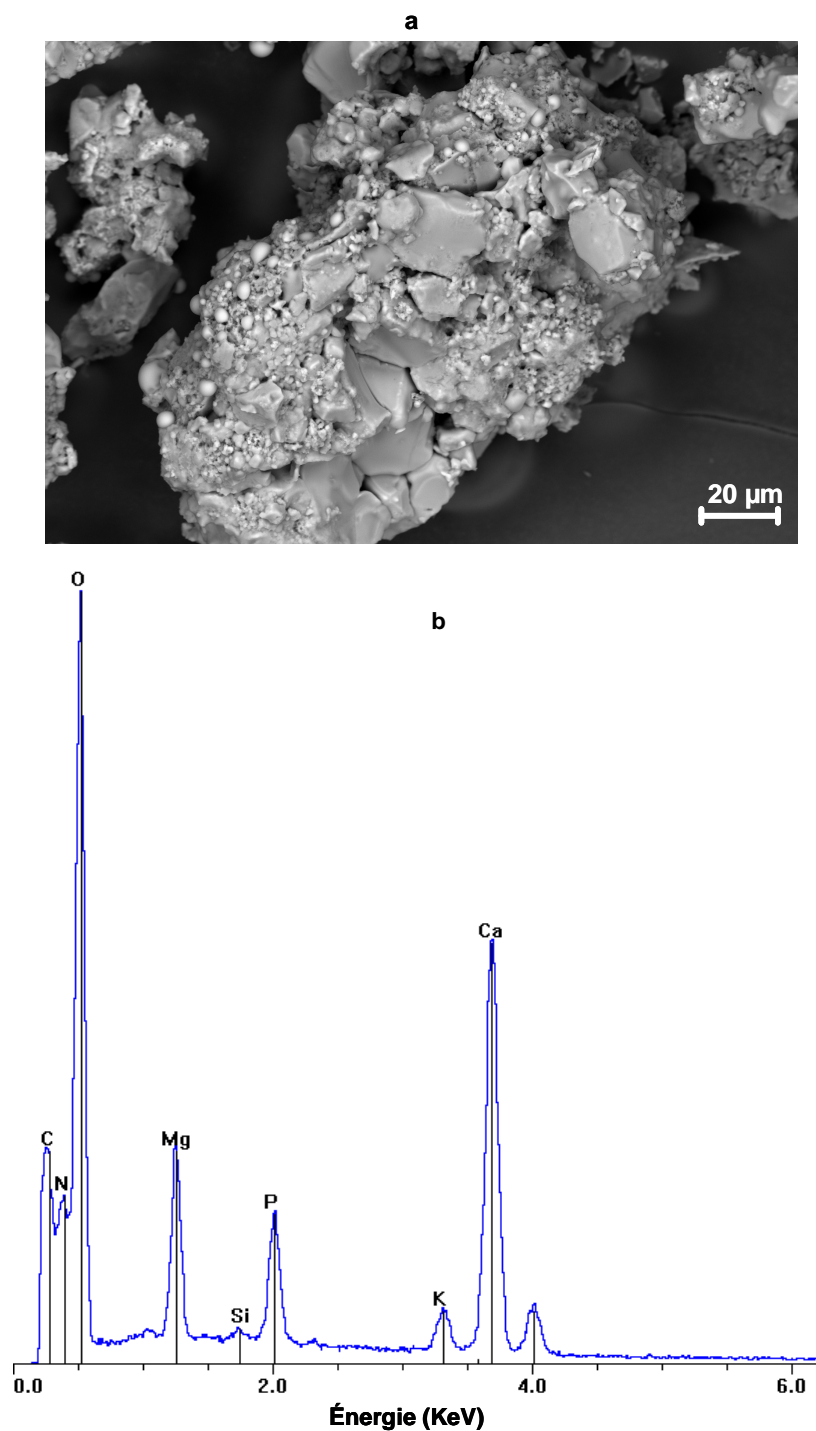


Figure 7.17 : a) Image SEM du culot desséché de la fraction D (HNO_3 2N) et b) spectre EDX correspondant

VII.6.3. Fraction C (H_2O) (Figures 7.18a et b)

La **Figure 7.18** montre l'image des cristaux issus de la dessiccation de la fraction C (a) et leur spectre EDX (b). De grands cristaux de KOH et NaOH sont présents.

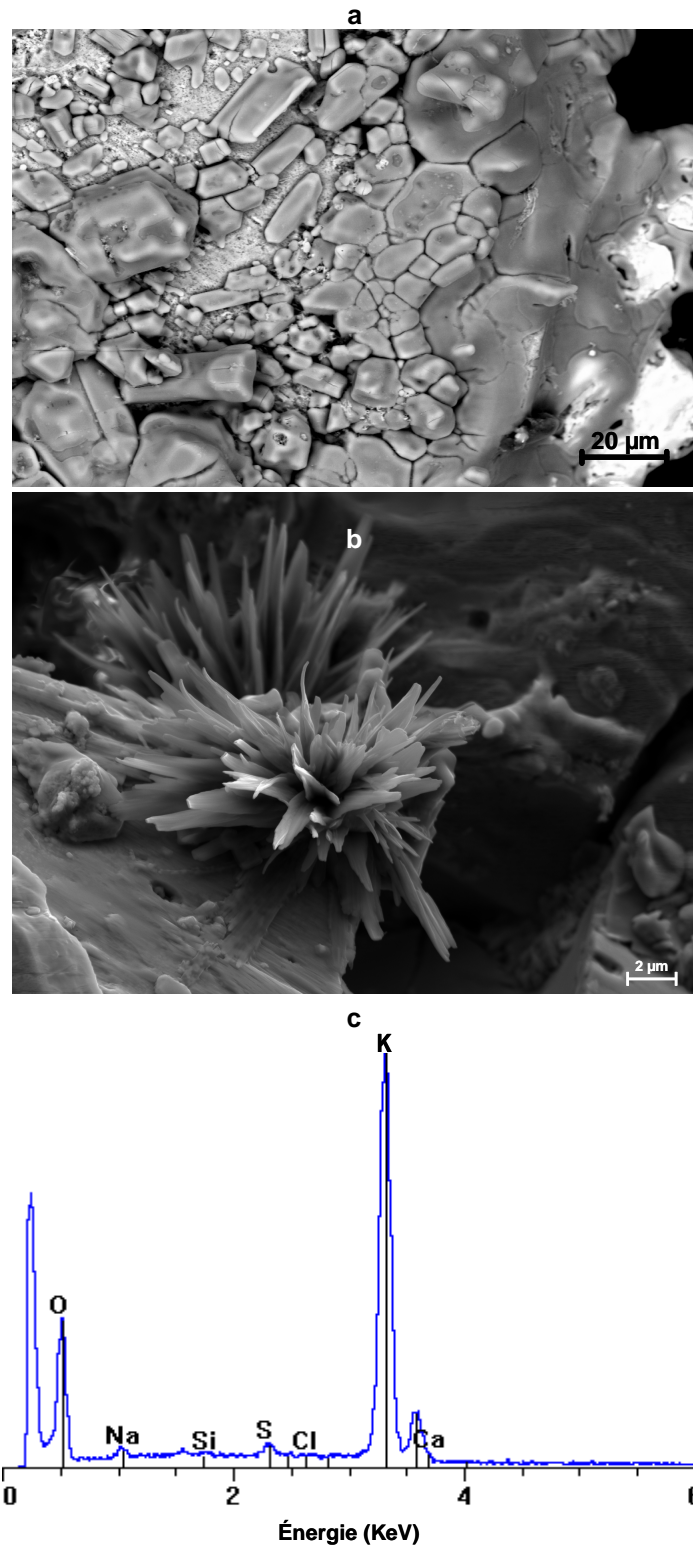


Figure 7.18 : a) Image SEM du culot desséché de la fraction C (H_2O) majoritairement constitué de K_2O , b) beau cristal de Na_2O et c) spectre EDX de la fraction C

VII.7. Analyse en ICP-MS des éléments présents dans les fractions C (H₂O), D (HNO₃ 2N) et E (résidu solide)

Les spectres globaux de SEM-EDX permettaient la quantification des éléments majeurs présents dans C, D, E. Cependant, les éléments traces (concentration moyenne inférieure à 50 à 100 µg.g⁻¹) ne pouvaient pas être dosés par SEM-EDX ni même être perçus, s'ils étaient dispersés dans la fraction, sans point de cristallisation permettant l'évaluation ponctuelle de leur concentration.

Pour une vue précise de la composition, il fallait donc combiner les analyses SEM-EDX et ICP-MS. Le **Tableau 7.2** donne la composition en 18 éléments dans ces fractions issues de l'analyse ICP-MS.

Tableau 7.2 : Distribution élémentaire moyenne (± E.T ; n=3) de 18 éléments dans les fractions C, D et E (µg pour 1g sec) de suber de frêne âgé de 4 ans.

	C	D	E
Mg	4,4 ± 0,1	1012 ± 30	13,3 ± 0,4
Al	6,6 ± 0,9	18,3 ± 2,4	22,1 ± 2,9
K	7842 ± 392	1197 ± 60	16,6 ± 0,8
Ca	114 ± 11	6872 ± 687	13,1 ± 1,3
Ti	< L.D	1,9 ± 0,2	3,4 ± 0,3
Cr	0,13 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,08 ± 0,00
Mn	4,5 ± 0,7	9,2 ± 1,4	49,7 ± 7,5
Fe	7,4 ± 1,1	3,0 ± 0,4	41,3 ± 6,2
Co	0,002 ± 0,000	0,36 ± 0,02	0,08 ± 0,00
Ni	0,005 ± 0,000	0,54 ± 0,03	0,086 ± 0,004
Cu	0,05 ± 0,00	19,5 ± 1,0	1,1 ± 0,1
Zn	0,09 ± 0,01	24,9 ± 2,5	2,6 ± 0,3
As	0,025 ± 0,003	0,09 ± 0,01	0,018 ± 0,002
Ag	0,014 ± 0,003	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Cd	0,001 ± 0,000	0,028 ± 0,006	0,016 ± 0,003
Sb	0,007 ± 0,001	0,088 ± 0,018	0,035 ± 0,007
Ba	0,09 ± 0,01	21,1 ± 1,3	0,74 ± 0,04
Pb	0,004 ± 0,000	0,076 ± 0,004	1,5 ± 0,1

La **Figure 7.19** visualise la distribution des 18 éléments dans les 3 fractions. On constate que la fraction C (H₂O) est majoritairement constituée de KOH mais contient des proportions non négligeables de Cr et As. Pour le fer et l'aluminium, ce pourrait être les hydroxydes qui seraient sélectivement dans cette fraction.

La fraction D (HNO₃ 2N) contient la quasi-totalité de Mg, Ca, Ba et l'essentiel de Cu. Zn, Ni, Co. Sb, Cd, Al, Ag se partagent entre les fractions D et E ; l'essentiel de Mn, Fe et Pb est concentré dans E. Le **Tableau 7.3** présente la concentration de chacun des 18 éléments étudiés dans la fraction E.

Sur le spectre global SEM-EDX de cette fraction, la perception d'un pic commence avec Ti et Zn, c'est-à-dire pour une concentration de l'ordre de $3000 \mu\text{g.g}^{-1}$. Le plomb, qui a une concentration proche de $2000 \mu\text{g.g}^{-1}$ n'est pas perçu, ce qui suggère une distribution très uniforme dans la masse de la fraction.

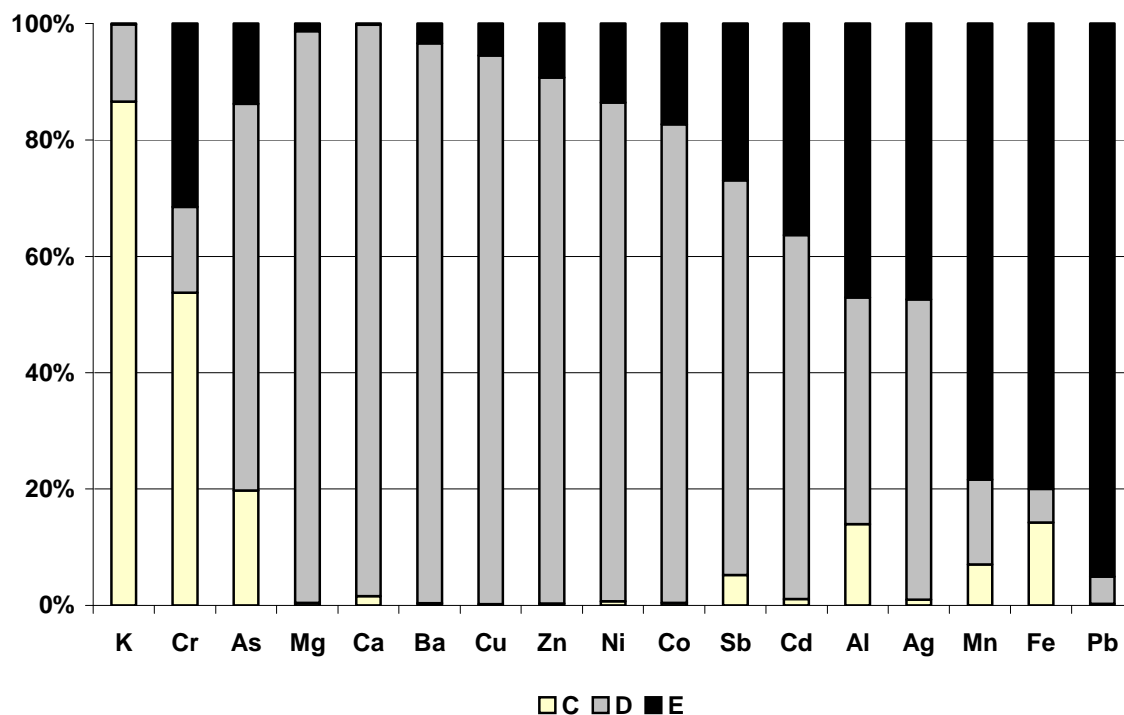


Figure 7.19 : Distribution élémentaire (%) de 17 éléments entre les fractions C, D et E

Tableau 7.3 : Concentrations ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de masse sèche) élémentaires moyennes (\pm E.T) dans la fraction E

E	
Mn	62099 \pm 9315
Fe	51637 \pm 7746
Al	27622 \pm 3591
K	20708 \pm 1035
Mg	16634 \pm 499
Ca	16432 \pm 1643
Ti	4210 \pm 421
Zn	3208 \pm 321
Pb	1926 \pm 96
Cu	1420 \pm 71
Ba	923 \pm 55
Ag	797 \pm 159
Ni	107 \pm 5
Cr	95 \pm 5
Co	94 \pm 5
Sb	44 \pm 9
As	22 \pm 3
Cd	20 \pm 4

VII.8. Discussion

Ce chapitre a permis de démontrer la présence d'une phase particulière solide qui, issue d'un transfert atmosphérique, s'accumule dans le dépôt de surface et dans le suber des tiges, sans accéder aux tissus internes symplasmiques. Cette phase solide apparaît douée d'une certaine stabilité dans le temps, contrairement aux formes élémentaires dispersées et solubilisées dans l'eau qui peuvent diffuser et se distribuer dans les tissus profonds. A ce titre, cette phase semble présenter un intérêt potentiel fort pour étudier l'évolution dans le temps et dans l'espace des particules atmosphériques.

Le protocole de purification que nous avons imaginé et mis en œuvre permet-il d'obtenir intégralement la phase solide initiale ? Certainement pas pour tous les éléments. La **Figure 7.20** montre le facteur de concentration du contenu de la fraction E par rapport à la masse initiale de suber. E représente 0,05% de la masse initiale de matière sèche.

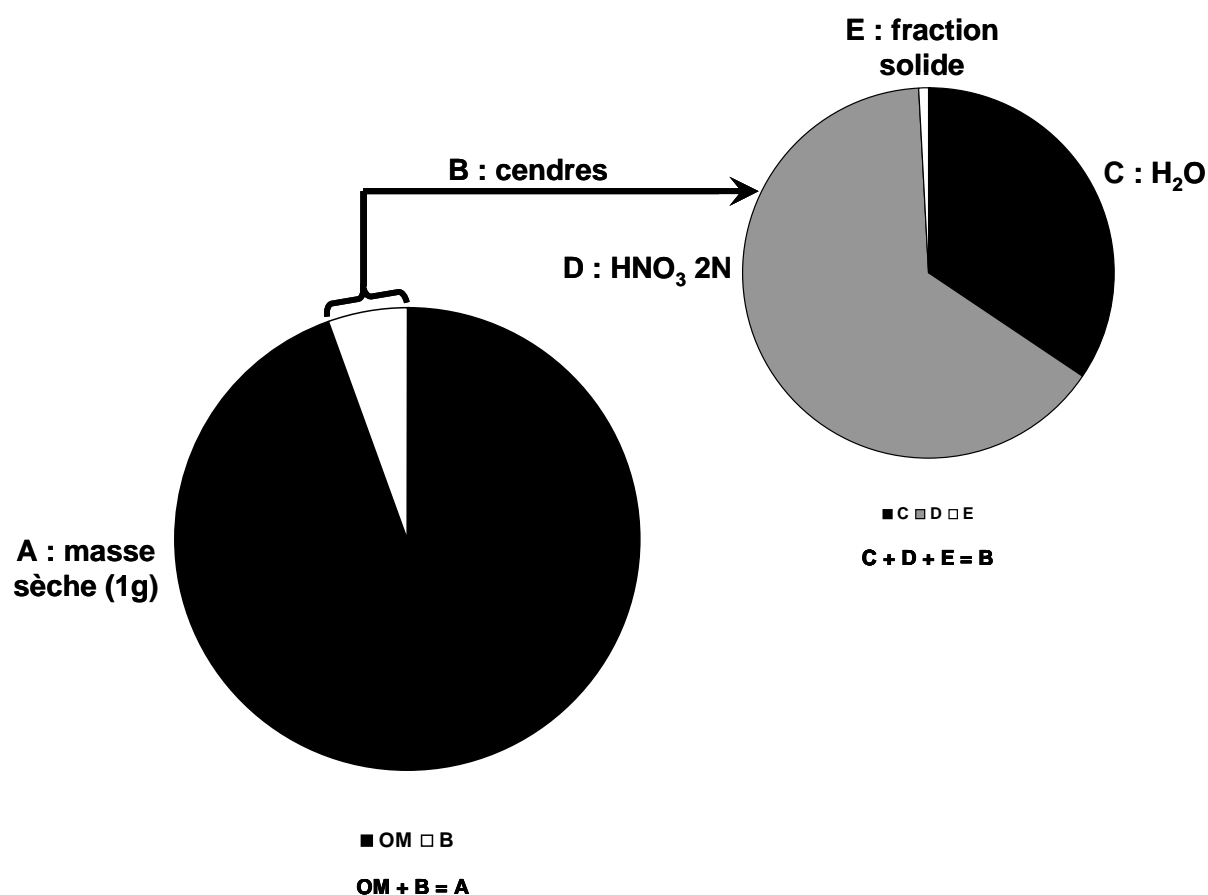


Figure 7.20 : Schéma illustrant l'importance quantitative de chaque fraction A, B, C, D et E ;
 $C + D + E = B$ = masse des cendres, C = fraction H_2O , D = fraction HNO_3 ,
 E = fraction solide résiduelle; OM, Matière Organique.

Le fait que la quasi-totalité du plomb, du fer et du manganèse se trouvent dans cette fraction E ouvre la voie d'une recherche parfaitement pertinente, disposant dans E d'une concentration en ces éléments très élevée (par exemple : près de 2000 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de plomb). Par contre, c'est dans la fraction D (HNO_3 2N) qu'il faut doser et étudier Mg, Ca, Ba, Cu, Zn, Ni, Co et Sb. Ces éléments ont pu être initialement dispersés dans la matrice, ou, au contraire y figurer à l'état de particules solides de petite taille mais qui sont rapidement solubilisés par HNO_3 2N. De ce point de vue, le cas du couple Cu/Zn dont on a pu trouver des particules dans les coupes et dont l'origine anthropique apparaissait comme très probable, est bien illustratif.

Certains éléments se distribuent de manière complexe entre C, D et E. Ceci pourrait correspondre à des différences de solubilité des sels d'un même élément ou des structures complexes auxquelles il est lié (exemple : manganèse) ou, au contraire à des différences de solubilité des isotopes d'un même élément. De ce point de vue, les cas de Cr, de Fe et de Si constituent sans doute des exemples intéressants.

Enfin, la fraction E apparaît comme une très bonne image de la fraction élémentaire d'origine géogénique, en tout cas en milieu non sédimentaire. Ceci peut révéler un intérêt très grand, par exemple pour suivre les apports de particules d'amiante ou encore pour évaluer l'impact des pratiques anthropiques, en particulier agricoles, sur les apports géogéniques, qui seront alors associés aux composés organiques ou minéraux spécifiques.

Chapitre VIII

Discussion - Conclusion

Sommaire

VIII.1. Récapitulatif des travaux réalisés	178
VIII.2. Les pollutions atmosphériques et leur déposition	179
VIII.3. La mesure du dépôt atmosphérique élémentaire sur les troncs d'arbres	180
VIII.4. Comparer ce qui était présent dans l'atmosphère à ce qui a été retenu par l'écorce d'arbre : un but à atteindre	182
VIII.5. Le dépôt, un mélange d'apports géogéniques, biogéniques et anthropogéniques.....	184
VIII.6. L'intégration d'une phase solide dans une matrice durable : l'espérance d'un archivage atmosphérique	186
VIII.7. Une piste nouvelle : l'exploration des intégrations aléatoires.....	186
VIII.8. La matrice "arbre" pour une utilisation cartographique et chronologique de la pollution atmosphérique élémentaire	187

VIII.1. Récapitulatif des travaux réalisés

Les travaux préliminaires de notre laboratoire tentaient d'utiliser le dépôt de polluants atmosphériques sur des troncs d'arbres, pour rendre compte de la distribution géographique de ces polluants. Les résultats obtenus nous ont montré qu'une étude méthodologique approfondie était nécessaire et qu'elle devait être couplée à une approche conceptuelle globale. C'est ce que nous avons tenté de faire.

L'innovation expérimentale et sa cohérence ont fait l'objet d'un chapitre spécifique qui aborde les différentes voies explorées : choix d'une espèce plus "pratique" que d'autres au vu des résultats antérieurs, mise au point d'un mode de prélèvement imposant de séparer un dépôt superficiel d'un dépôt intégré, longue mise au point d'un fractionnement tissulaire démontrant que le suber constituait une matrice d'intérêt exceptionnel, série de mesures et de calculs montrant que la sève brute apportait un mélange d'éléments extraits du sol, les uns indispensables à la vie de l'arbre, les autres non indispensables et perturbant l'évaluation mathématique de l'apport atmosphérique. Cette phase du travail a permis de consolider notre mode de calcul d'AAEF en posant les principes et en esquissant les formules de correction. Nos mesures transpiratoires des tiges montrent que le flux venant de l'intérieur n'était nullement négligeable et qu'il apportait majoritairement des éléments nutritifs autorisant le développement d'un écosystème de surface (pouvant héberger lichens et mousses bioindicateurs) qui redistribuait les polluants atmosphériques déposés et nous amenait à une vision de l'écosystème qui était celle d'un ensemble déjà très complexe. Parallèlement, nous avons expérimenté un dispositif de collecte des eaux de pluie ruisselant sur les troncs qui nous montra que le dépôt de surface avait une durée de vie limitée, modulée par les aléas atmosphériques.

Notre espérance de disposer d'une matrice accumulant durablement les polluants atmosphériques s'est orientée alors sur le suber. Grâce aux méthodes PIXE, puis SEM-EDX, il nous fut possible de démontrer que ce tissu, et lui seul, pouvait accumuler des particules solides riches en éléments, voire même exclusivement composés de telles entités. Cela nous conduisit à concevoir un système de fractionnement du contenu élémentaire du suber, applicable à d'autres matrices et qui apporte des possibilités marquantes : isoler une fraction géogénique, isoler des cendres volantes caractéristiques et en permettre l'étude, mesurer la distribution en taille des particules, accéder à des études de spéciation et disposer d'un dispositif de dosage des éléments très amélioré par le fait que beaucoup se trouvent

concentrés et franchissent largement les seuils de détection. Ce fractionnement, enfin et surtout, permet de séparer, dans les matrices, des ensembles d'éléments à l'état solide, durable, des fractions dispersées, souvent lessivables et délocalisables dans les tissus, du fait de leur solubilité.

Les résultats de l'ensemble des méthodes mises en œuvre permettent d'esquisser une vision – encore fragmentaire et en partie discutable – des processus de déposition et d'accumulation des éléments sur et dans les troncs des arbres et de ce que l'on peut en attendre pour un suivi des contaminations atmosphériques. Les différents aspects de cette démarche sont abordés dans les pages suivantes.

VIII.2. Les pollutions atmosphériques et leur déposition

Les particules solides de petite taille en suspension dans l'air constituent sans nul doute un support majoritaire des contaminations élémentaires. Leur distribution dans le temps et l'espace subit d'énormes variations. Elles coexistent dans l'ensemble atmosphérique, avec des formes très dispersées, souvent adsorbables, parfois solubles dans la vapeur d'eau ou l'eau liquide, complexables avec des molécules organiques (tensio-actifs par exemple), qui sont vraisemblablement dotées d'une réactivité beaucoup plus grande, en particulier à l'égard du vivant.

L'étude de ce mélange atmosphérique complexe se fait directement grâce à des méthodes très diversifiées (Just *et al.*, 1968 ; Bris *et al.*, 1999 ; Leifer *et al.*, 2002 ; Yue *et al.*, 2006). De plus, sachant que le devenir normal de ce mélange sera de se déposer à la surface de la terre, de nombreuses études se développent, concernant ce processus de dispersion et sa capacité à changer la composition du substrat (les sols, l'eau...) en s'accumulant, et de changer aussi la fonctionnalité du vivant, lui aussi exposé à cette déposition.

Les contaminations atmosphériques par les éléments, au contraire des contaminants organiques qui peuvent découler de synthèses originales, sont en fait le résultat d'un déplacement dû à l'activité humaine d'éléments à potentialité toxique, de lieux naturels de concentration (régions minières par exemple) vers d'autres lieux qui en étaient exempts. Pour évaluer ce processus de transfert préoccupant, la description cartographique, à long terme, de la déposition, paraît une démarche fondée.

Parallèlement, il est légitime d'y coupler des études toxicologiques et écotoxicologiques qui tenteront de préciser l'impact biologique de cette déposition. Un premier constat d'impact

biologique des particules déposées est, sur les végétaux, de réduire l'intensité photosynthétique des feuilles (Farmer, 1993 ; Hermle *et al.*, 2006 ; Neves *et al.*, 2009) et, sur les animaux, d'altérer la fonctionnalité des organes d'échange gazeux (poumons ou branchies) (Pritchard, 1989 ; Hattis *et al.*, 2001). D'autres perturbations fonctionnelles, touchant la physiologie des organes et des cellules, ont pour origine Hg, Pb, As, Cd, Cu ou des silicates comme l'amiante (Schlipkötter, 1986).

Dans ce contexte, ce mémoire de thèse se concentre bien sur un processus de déposition et d'intégration de la pollution atmosphérique et sur la mise au point de méthodes qui permettent d'obtenir en quantités importantes le mélange déposé à partir de l'atmosphère, avec un taux de contamination par les apports biologique et géogéniques, qui reste maîtrisable, contrairement à ce qui se passe dans un sol. Les dépôts ainsi obtenus pourraient être le point de départ d'études toxicologiques fondées.

VIII.3. La mesure du dépôt atmosphérique élémentaire sur les troncs d'arbres

Mesurer directement le dépôt atmosphérique sur des sols ou sur des plans d'eau n'a de sens que pour des pollutions massives. C'est le cas de la contamination du sol des vignobles par le cuivre, suite à des traitements à la bouillie bordelaise qui se répètent depuis le XIX^{ème} siècle (Deluisa *et al.*, 1996 ; Mirlean *et al.*, 2007). Dans les cas plus courants, la complexité fonctionnelle des écosystèmes rend extrêmement difficile la mesure de l'apport atmosphérique vers les sols et les sédiments.

Dans ces conditions, choisir une matrice d'étude qui s'élève au dessus du sol, de très grande longévité et partiellement abritée de la pluie grâce au port vertical et, enfin, extrêmement répandue en milieu tempéré, tropical et même équatorial apparaît comme un bon choix, qui est celui de l'arbre.

Si notre travail a contribué à démontrer que l'écorce d'arbre n'est pas une matrice miraculeuse ni même simple, elle a, cependant fait apparaître un avantage capital : c'est un véritable calendrier, grâce à la succession des pousses annuelles, de cicatrice de bourgeon en cicatrice des bourgeons précédents. On peut donc déterminer avec précision l'âge de rameaux, des branches ou du tronc où des prélèvements sont effectués (**Figure 8.1**).

Une autre voie d'étude chronologique était celle des cernes du bois. Les expériences liminaires que nous avons réalisées sur cette matrice nous ont montré qu'on ne pouvait pas –

actuellement – maîtriser la mobilité élémentaire entre cernes, ce qui rendait équivoques les dosages cerne par cerne.

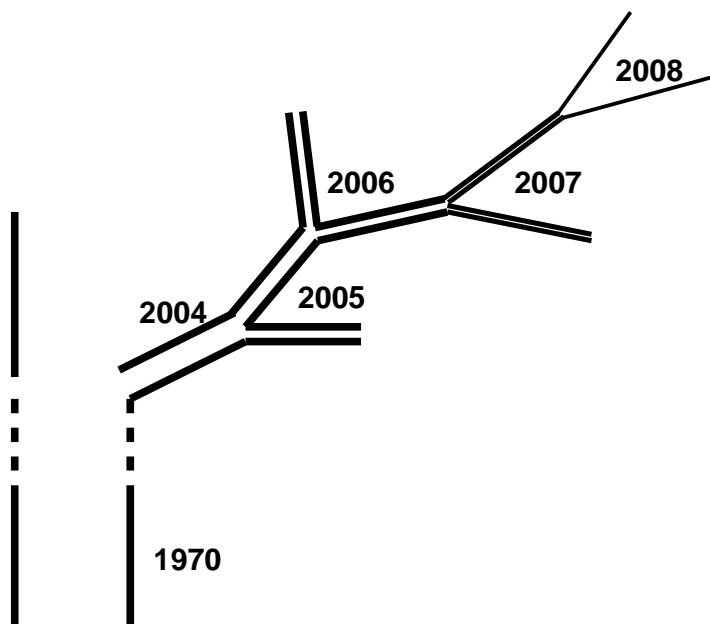


Figure 8.1 : Schéma illustrant la succession des rameaux d'âges différents sur un même arbre

Cette démarche de datation axiale dans ce travail, nous a permis de démontrer, en particulier, la très grande vitesse de formation du dépôt sur des pousses de quelques mois. Ce dépôt, à la surface des tiges, n'est pas réellement cumulatif : il est le résultat d'une succession de phases, définies par la météorologie surtout, les unes favorables à une intense déposition, les autres au lessivage. Ce dépôt n'est pas homogène à la surface de la tige. L'obtention d'une composition et d'une valeur moyenne nécessite de le prélever sur de très grandes surfaces (plusieurs dizaines de dm^2). La phase de déposition est associée à une phase d'intégration à l'intérieur des tiges qui est extrêmement complexe au fur et à mesure que l'on passe vers des tissus plus internes où les apports de la sève brute ont une influence marquée. Par contre, chez les dicotylédones et les gymnospermes, l'existence d'un suber superficiel (mort), constitue un avantage essentiel que nous avons démontré chez le frêne. Le suber apparaît comme une matrice semi-cumulatrice, retenant des éléments en quantités importantes, soit sous forme dispersée, soit sous forme particulière. La très grande persistance de ce tissu, son caractère lipophile, la possibilité de le prélever assez sélectivement et sans dommage vital pour l'entité biologique en font un matériel de choix pour l'étude de la déposition atmosphérique.

Ce travail s'est concentré sur l'analyse des mécanismes intervenant chez une seule espèce d'arbre, le frêne, dans la fixation des apports atmosphériques élémentaires, de manière à

préciser la "représentativité" du mélange élémentaire qu'il contenait vis-à-vis du mélange élémentaire atmosphérique.

Quelques comparaisons nous ont permis de voir que l'espèce végétale avait un rôle qu'on ne pouvait négliger : entre un bouleau et un frêne, les niveaux de manganèse interne sont sans commune mesure. Le choix d'une espèce d'arbre, pour des études de terrain, nécessite, ainsi, de connaître les aptitudes "hyperaccumulatrices" ou "hypoaccumulatrices" vis-à-vis de chacun des éléments qui nous intéressent. La très grande abondance du frêne, dans notre région, avec une très forte amplitude altitudinale (environ 200 à 1700 m) fait que cette espèce, maintenant bien connue du point de vue de son aptitude bioindicatrice, est pratiquement bien utilisable pour des études ultérieures. Pour d'autres types d'écosystèmes terrestres, d'autres espèces d'arbres restent à étudier, comme cela a été fait au laboratoire pour l'Arganier (Ayrault *et al.*, 2007a)

VIII.4. Comparer ce qui était présent dans l'atmosphère à ce qui a été retenu par l'écorce d'arbre : un but à atteindre

Une étude de déposition sur une matrice comme les troncs d'arbres mène à deux types d'informations : 1) une description géographique et chronologique des dépôts ; 2) une estimation de la charge écotoxicologique, au sens le plus large, qu'un tel dépôt peut représenter. La confluence de ces deux types de données nous informe donc sur les changements de composition et de propriétés biologiques d'un espace. Pour assurer totalement la fiabilité de telles études, il est nécessaire de connaître avec une grande précision quelle relation existe entre la présence atmosphérique de composés et la déposition sur la matrice, qualitativement et quantitativement. Cette nécessité dépasse totalement le cadre de ce mémoire. Au moins, avons-nous apporté plusieurs résultats préparatoires à cette démarche :

- 1) Un dépôt de surface se constitue sur les tiges en moins de 3 mois, avec une composition élémentaire comparable à celle d'une tige de 4 ans. Un prélèvement d'atmosphère en continu pendant la même période (3 mois) et sur le même lieu rend possible la comparaison.
- 2) Une culture d'arbre en atmosphère contrôlée filtrée donne des teneurs en éléments traces très faibles et que nous avons mesurées.

- 3) En station d'altitude (1100 m) (les Seiglières), le mélange déposé est de même composition que la station campus, mais l'intensité de ce dépôt atmosphérique est approximativement 8 fois plus faible.
- 4) Nous disposons des résultats d'une série continue de mesure des particules atmosphériques faite à Saclay pendant 18 mois (**Tableau 8.1**). Quelles sont les analogies et les différences entre les profils, déposés sur frêne à Grenoble et prélevés dans l'atmosphère, à Saclay (les deux séries de mesure étant faites par ICP-MS avec les mêmes appareils et les mêmes expérimentateurs) ? Cette comparaison démontre des différences de "profil global" notoires, en particulier pour V, Pb et Sb.

Sur le point 4), la comparaison ne peut pas porter sur des concentrations au sens strict, un matériel donnant des quantités d'éléments par unité de masse de dépôt ou par unité de surface (cas de l'arbre), l'autre donnant des concentrations en masse par m^3 d'air. Par contre, la comparaison est possible pour les relations quantitatives entre les différents éléments. La démarche retenue a consisté à exprimer la concentration d'un élément par rapport à la masse de 17 éléments présents dans les 2 cas et qui ne sont pas les éléments majeurs, ni du vivant, ni de la croûte terrestre. Le **Tableau 8.1** compare ainsi les concentrations relatives de ces 17 éléments entre les valeurs moyennes issues de 18 mois de prélèvement atmosphérique à Saclay et de 18 mois de dépôt sur frêne cultivé sur le campus de Grenoble.

Ces concentrations relatives sont très comparables pour le fer (élément très majoritaire en masse), le lanthane, le strontium, le manganèse et le nickel. Ces concentrations sont approximativement doubles à Saclay pour Zn, V, Ti, As, Cu, Cr, Ba. Cd est triple à Saclay. Deux éléments y sont fortement majoritaires : Pb (5 fois) et Sb (70 fois). Notons que pour Cd et Sb, les concentrations se situent à des valeurs basses. Cette comparaison permet de suggérer que, à Saclay comme à Grenoble, et comme dans bien d'autres zones urbaines (Cordoba, Amman, Edimbourg, Cologne...) (Carreras et Pignata, 2002 ; El-Hasan *et al.*, 2002 ; Heal *et al.*, 2005 ; Lehdorff et Schwark, 2008) il existe un mélange de fond d'éléments traces, résultant d'une émission issue de l'ensemble des activités anthropiques (industries, chauffage, trafic...) qui sont, en fait, la signature dans sa globalité du complexe urbain de pays développés.

Par contre, alors que par la démarche d'AAEF sur nos matériels, on voyait se manifester des éléments comme V ou Sb, on constate que Saclay se caractérise par une contribution spécifique très forte de Pb et Sb. La cause est actuellement ambiguë : s'agit-il d'une nouvelle pratique industrielle de la conurbation parisienne, ou au contraire d'une conséquence de

l'emploi massif du plomb dans une conurbation très dense, ancienne, où Pb était toujours associé à Sb (Shotyk *et al.*, 2004) ? Peut-il s'agir d'un fait purement géologique ?

Tableau 8.1 : Profils comparés de concentrations relatives pour l'atmosphère de Saclay et les dépôts sur frêne à Grenoble pendant la même période

Elément	Grenoble	%	Saclay	%	Saclay/Grenoble (%)
Fe	9642	87,7	483	75,6	86
Zn	308	2,8	46	7,2	257
Ti	230	2,1	30	4,7	224
Cu	164	1,5	18,4	2,9	193
Mn	164	1,5	7,0	1,1	73
Ba	152	1,4	13,0	2,0	143
V	76	0,7	10,3	1,6	229
Sr	62	0,6	3,0	0,5	83
Pb	58	0,5	15,4	2,4	480
Ni	45	0,4	2,2	0,3	75
Cr	42	0,4	4,1	0,6	150
Rb	26	0,2	0,7	0,11	55
La	7	0,06	0,36	0,06	100
Co	6	0,05	0,21	0,03	60
As	6	0,05	0,72	0,11	220
Cd	2	0,02	0,39	0,06	300
Sb	1	0,01	4,5	0,7	7000

Ceci est invraisemblable, Grenoble étant marqué, pour une part, par des étages géologiques très anciens (Belledonne) riches en métaux, alors que Saclay est supporté par le bassin parisien, sédimentaire (jurassique et crétacé). La comparaison atmosphérique directe des 2 stations devra être faite pour éclairer cette question et écarter le risque d'une représentativité éventuellement seulement partielle des dépôts sur les arbres vis-à-vis de ce qui a transité réellement dans l'atmosphère.

VIII.5. Le dépôt : un mélange d'apports géogéniques, biogéniques et anthropogéniques

Un résultat, somme toute, fondamental de notre travail, a consisté à démontrer que tout le dépôt superficiel, en particulier sur les troncs, méritait réellement le statut d'un écosystème avec des êtres vivants (algues, microorganismes...), de la matière organique morte et des éléments minéraux, et qui avait pour caractéristique principale d'être reviviscent en fonction des apports d'eau. C'est donc une matrice complexe où l'expression en concentration d'un élément ne permet pas d'interprétation directe féconde.

De la même manière, les matrices internes au végétal sont complexes, mélangeant apoplaste et symplasma, éléments structuraux et éléments exogènes, apportés par la sève ou par l'atmosphère. Nous avons donc tenté, dans de telles matrices, d'évaluer la nature et la quantité des éléments qui pouvaient provenir de l'atmosphère et qui étaient issus d'une activité anthropique.

Au plan théorique, la distinction entre anthropique, géogénique et biogénique, sans être totalement claire, est nécessaire. Dans un matériel vivant, les éléments biogéniques sont ceux qui sont nécessaires au fonctionnement du vivant, auxquels s'ajoutent ceux que l'être vivant terrestre absorbera inévitablement à partir du sol, eu égard à la composition de celui-ci.

Les éléments dits "géogéniques" apportés par l'atmosphère sont ceux qui sont apportés à la matrice à partir de la croûte terrestre, généralement en abondance à partir de son environnement immédiat mais aussi à grande distance.

Les éléments dits "anthropogéniques" sont ceux qui sont produits en abondance par l'activité humaine à partir de sources situées ailleurs (mines) ou incluses (exemple : carburants fossiles ou combustibles actuels). On a vu les ambiguïtés possibles de cette classification : les composés issus de la croûte terrestre comme les poussières de carrière ou les sols nus travaillés par l'agriculture peuvent se retrouver en masse dans l'atmosphère, représentant ainsi un apport anthropogénique de composés qualitativement géogéniques.

Une démarche récente de divers auteurs (Weiss *et al.*, 1999 ; Reimann et De Caritat, 2000 ; Cizdziel et Hodge, 2000 ; Gaudry *et al.*, 2008) avait permis de quantifier les anomalies de concentration dues à l'activité anthropique par la création d'un "facteur d'enrichissement" ("enrichment factor") qui était un concept intéressant mais d'usage ambigu. Nous avons tenté, comme exposé dans le chapitre VI de ce mémoire, d'élaborer un autre mode de calcul : l'AAEF, qui nous a paru prometteur, mais qui reste à conforter par une mise en œuvre diversifiée. Un intérêt majeur de ce calcul a sans doute été de faire émerger la liste des éléments massivement anthropogéniques avec de nouveaux venus comme le vanadium ou l'antimoine. Il fait également émerger le cuivre alors qu'il modère l'influence du zinc et celle du cadmium dans notre station. Les différences théoriques fortes entre AAEF et "enrichment factor" sont que 1) l'AAEF tient compte du profil élémentaire structurel de la matière organique 2) que la fraction géogénique est fondée, non sur une formule générale ubiquiste et, donc, forcément inexacte, mais sur une formule adaptée à la géologie du site.

VIII.6. L'intégration d'une phase solide dans une matrice durable : l'espérance d'un archivage atmosphérique

L'idée de trouver dans des arbres les traces des apports atmosphériques aériens est évidemment séduisante. Elle a nourri plusieurs recherches sur le contenu minéral des cernes de bois (Barnes *et al.*, 1976 ; Bindler *et al.*, 2004 ; Sirito de Vives *et al.*, 2006 ; Martin *et al.*, 2006). Mieux, Bellis *et al.* (2002, 2003, 2004) ont eu l'astucieuse idée d'étudier la composition des écorces enfermées dans des zones cicatricielles de troncs d'arbres (les "bark pockets") (Bellis *et al.*, 2002, 2003, 2004) pensant qu'elles conserveraient la trace des dépôts atmosphériques avant l'enfermement.

En ce qui nous concerne, le chapitre VII de ce mémoire a montré qu'on pouvait étudier une fraction particulière solide dans le suber, qui concentrait l'essentiel du plomb, du fer et du manganèse. Le protocole de purification de cette fraction, que nous avons mis au point, apparaît fiable et devrait permettre de voir si ces particules intégrées apportent ou non une information décisive sur les atmosphères des décennies et même du siècle passés. Dans cette fraction, la présence abondante de la fraction géogénique semble porteuse d'informations sur les changements du climat par l'examen de la nature des minerais fixés et des rapports silice pure/argiles/micas par exemple.

VIII.7. Une piste nouvelle : l'exploration des intégrations aléatoires

L'examen en SEM-EDX de nombreuses préparations (dépôts de surface, coupes dans les tiges, cendres, fraction E après traitement acide...) nous a montré la présence d'éléments sporadiques comme les "fly ashes" et des particules de métal ou de sels métalliques à l'état pur. Le **Tableau 8.2** donne une liste des éléments ainsi détectés.

La capacité de fixation d'une particule non commune de ce type, ayant une taille suffisante (≥ 2 à $3 \mu\text{m}$) pour assurer une identification incontestable, apparaît comme un processus rare. Il nous semble intéressant d'envisager un examen systématique de nombreuses préparations en SEM-EDX, issues de périodes différentes, pour voir si la fréquence d'apparition d'un certain type de particules (et non la concentration totale de l'élément considéré) était caractéristique ou non d'une période.

Tableau 8.2 : Liste des éléments d'origine anthropogénique détectés en SEM-EDX

Elément	Formule chimique supposée	Echantillon
Fe	Fe, O, Al, Ca Caresite $\text{Fe}^{2+}_4\text{Al}_2(\text{CO}_3)(\text{OH})_{12} \cdot 3(\text{H}_2\text{O})$	Face supérieure suber frêne 4 ans
Fe	Fe, O Hématite Fe_2O_3	Face supérieure suber frêne 4 ans
Mg	Mg, O, Si, Fe Olivine $(\text{Mg}, \text{Fe})_2\text{SiO}_4$	Coupe transversale suber Frêne 4 ans
Al	Al, O Alumine Al_2O_3	Coupe transversale suber Frêne 4 ans
Pb	Pb, O Minium Pb_2O_4	Coupe transversale suber Frêne 4 ans
F	F, O, Al, Ca	Coupe transversale suber Frêne 4 ans
Fe	O, Fe, Cl Akaganeite	Coupe transversale suber Frêne 4 ans
F	Al, F, Ca, O	Coupe transversale suber Frêne 4 ans
Cu	Cu, O Tenorite CuO	Coupe transversale suber Frêne 4 ans
Ti	Si, Ca, Ti, K, Fe Ilmenite $\text{Fe}^{2+}\text{TiO}_3$	Cendres de suber traitées à HCl 2N
Al	Al, O Alumine Al_2O_3	Cendres de suber traitées à HCl 2N
Zr	Zr, Si, O Zircon ZrSiO_4	Résidu de cendres suber HNO_3 2N
Fe	O, Fe Hématite Fe_2O_3	Résidu de cendres suber HNO_3 2N
Cu	Cu, O, Si, P, Al Tenorite CuO	Résidu de cendres suber HNO_3 2N
Fe	O, Fe Magnétite Fe_3O_4	Résidu de cendres suber HNO_3 2N
Si, Al	O, Si, Al Mullite (c.v) $\text{Al}_4\text{SiO}_{10}$	Résidu de cendres suber HNO_3 2N
Zr	Zr, Si, O Zircon (c.v) modelite ZrSiO_4	Résidu de cendres suber 10 ans HNO_3 2N
Al	Al métal ou Alumine (c.v)	Résidu de cendres suber 10 ans HNO_3 10N
Zr	Si, Al, Zr, O Zircon ZrSiO_4	Résidu de cendres suber 10 ans HNO_3 10N
Ti	O, Si, Al, Ti, K Rutile TiO_2	Résidu de cendres suber 10 ans HNO_3 10N
Al	Al, O, Si Mullite (c.v altérée) $\text{Al}_4\text{SiO}_{10}$	Résidu de cendres suber 10 ans HNO_3 10N
Ti	Ti, Si, O, Al, K Rutile TiO_2	Résidu de cendres suber 10 ans HNO_3 10N
Fe	Fe, O, Si, Al Magnétite Fe_3O_4	Résidu de cendres suber 10 ans HNO_3 10N
Fe	O, Fe Hématite Fe_2O_3	Résidu de cendres suber 4 ans H_2SO_4
Fe	O, Fe Hématite Fe_2O_3	Résidu de cendres suber 4 ans H_2SO_4
Zn	Zn métal	Coupe transversale frêne 40 ans traitée à la javel
Fe	Fe, O, Si, Ca Ilvaite $\text{CaFe}_3^{2+}(\text{SiO}_4)_2(\text{OH})$	Dépôt sur rameau frêne 4 ans
Fe	O, Fe, Zn	Dépôt traité H_2O_2 frêne 4 ans
P	Ca, P, O Apatite $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH}, \text{Cl}, \text{F})$	Dépôt traité H_2O_2 frêne 4 ans
Ni	Ni, Cr Alliage	Dépôt traité H_2O_2 frêne 4 ans
Ti	O, Ti, Si, Al Rutile TiO_2 Souvent associé au quartz : $\text{SiO}_2 + \text{Al}_2\text{O}_3 = \text{mullite}$	Dépôt traité H_2O_2 frêne 4 ans
Fe	O, Fe Hématite Fe_2O_3	Cendres bois 4 ans
Fe	O, Fe Wustite FeO	Coupe transversale frêne 4 ans bois
Al	Al, O Alumine Al_2O_3	Coupe transversale frêne 4 ans bois
Fe	Fe, O, Si Hématite Fe_2O_3	Fraction abrasée frêne 4 ans
Fe	Fe, O Magnétite Fe_3O_4	Fraction abrasée frêne 4 ans
Fe	O, Fe, Si Wustite FeO	Fraction abrasée frêne 4 ans
Ti	Ti, Si, O Rutile TiO_2 ou Ti métal	Fraction abrasée frêne 4 ans

c.v : cendre volante

VIII.8. La matrice "arbre" pour une utilisation cartographique et chronologique de la pollution atmosphérique élémentaire

La connaissance que nous avons rassemblée sur l'intégration des polluants atmosphériques élémentaires chez le frêne amène actuellement notre équipe à faire une comparaison de plusieurs stations colonisées par cet arbre :

- deux stations de montagne : Les Seiglières (1100 m) et Névache (1700 m)
- une station à pollution atmosphérique forte : le "couloir de la chimie" au sud de Lyon et l'environnement de Rive-de-Gier (industrie des métaux).

Notre étude se focalise sur la composition du dépôt de surface et sur les contenus subériens. Elle fait l'objet d'un soutien financier régional.

Notre méthodologie d'approche couplée ICP-MS, SEM-EDX, nous a permis, dans ce cas d'établir une typologie d'émission sidérurgique (aciers spéciaux, Chateauneuf, Loire) extrêmement caractéristique et précise (travaux en cours).

Au total, si le protocole expérimental que nous avons construit paraît bien argumenté au plan théorique, en vue d'établir des diagnostics géographiques et climatologiques, les quelques validations que nous avons entreprises par comparaison de stations à typologies très différentes sont globalement encourageantes. Il est évident qu'une longue période de validation globale minutieuse et prudente s'ouvre maintenant pour transformer notre démarche expérimentale en une pratique de routine, simplifiée si possible, sans perdre, ni sa précision, ni son sens.

Bibliographie

- Afsar, H. and Demirata, B., 1987. Simple method for distinguishing maneb, zineb, mancozeb, and selected mixtures. *Association of Official Analytical Chemists journal (USA)* 70, 923-924.
- Asta, J., Erhardt, W., Ferretti, M., Fornasier, F., Kirschbaum, U., Nimis, P.L., Purvis, W., Pirintsos, S., Scheidegger, C., Van Haluwyn, C., Wirth, V., 2002. Mapping lichen diversity as an indicator of environmental quality. In PL. Nimis, C., Scheidegger and P. Wolseley, (Eds.). *Monitoring with Lichens - Monitoring Lichens*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 273-279.
- Ayrault, S., Bonhomme, P., Carrot, F., Amblard, G., Sciarretta, M.D. and Galsomiès, L. 2001. Multianalysis of trace elements in mosses with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Biological Trace Element Research* 79(2), 177-184.
- Ayrault, S., Ezzahra El Alaoui-Faris, F., Asta, J., Tissut, M., Daudin, L., Mariet, C., Ravanel, P., Gaudry, A. and Cherkaoui, R., 2007a. A PIXE and ICP-MS analysis of metallic atmospheric contaminants in tree bark tissues, a basis for biomonitoring uses. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 70, 742-749.
- Ayrault, S., Clochiatti, R., Carrot, F., Daudin, L., Bennett, J.P. 2007b. Factors to consider for trace element deposition biomonitoring surveys with lichen transplants. *The Science of the Total Environment*. 372, 717-727.
- Ayrault, S., Catinon, M., Clochiatti, R., Tissut, M., Asta, J., 2009. Complementarity of analytical tools in biomonitoring studies. *Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry*. 281, 131-136.
- Aznar, J.C., Richer-Laflèche, M., Bégin, C., Rodrigue, R., 2008. Spatiotemporal reconstruction of lead contamination using tree rings and organic soil layers. *The Science of the Total Environment* 407, 233-241.
- Bargagli, R., 1998a. Higher plant as biomonitors of airborne trace elements. In *Trace Elements in Terrestrial Plants: an Ecophysiological Approach to Biomonitoring and Biorecovery*. Ed. R. Bargagli. pp. 238-262. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Bargagli, R., 1998b. Lichens as Biomonitors of Airborne Trace Elements. In *Trace Elements in Terrestrial Plants: an Ecophysiological Approach to Biomonitoring and Biorecovery*. Ed. R. Bargagli. pp. 179-206. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Bargagli, R., 2000. Trace metals in Antarctica related to climate change and increasing human impact. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 166, 129-173.

- Barkman, J.J., 1958. Phytosociology and ecology of cryptogamic epiphytes. Van Gorcum, Assen. 628 pp.
- Barnes, D., Hamadah, M.A., Ottaway, J.M., 1976. The lead, copper and zinc content of tree rings and barks. A measurement of local metallic pollution. *The Science of the Total Environment* 5, 63-77.
- Bates, J.W. and Brown, D.H., 1981. Epiphyte differentiation between *Quercus petraea* and *Fraxinus excelsior* trees in a maritime area of South West England. *Vegetatio* 48, 61-70.
- Belandria, G., Asta, J., Nurit, F., 1989. Effects of sulphur dioxide and fluoride on ascospore germination of several lichens. *Lichenologist*, 21, 79-86.
- Bellis, D., Ma, R., Bramall, N., McLeod, C.W., 2000. Airborne emission of enriched uranium at Tokai-mura, Japan. *The Science of the Total Environment* 264, 283-286.
- Bellis, D.J., Cox, A.J., Staton, I., McLeod, C.W., Satake, K., 2001a. Mapping airborne lead contamination near a metals smelter in Derbyshire, UK: spatial variation of Pb concentration and "enrichment factor" for tree bark. *Journal of Environmental Monitoring* 3, 512-514.
- Bellis, D.J., Ma, R., Bramall, N., McLeod, C.W., Chapman, N., Satake, K., 2001b. Airborne uranium contamination as revealed through elemental and isotopic analysis of tree bark. *Environmental Pollution* 114, 383-387.
- Bellis, D.J., Satake, K., Noda, M., Nishimura, N., McLeod, C.W., 2001c. The potential of elemental and isotopic analysis of tree bark for discriminating sources of airborne lead contamination in the UK. *Journal of Environmental Monitoring*. 3, 194-197.
- Bellis, D.J., Satake, K., Nodal, M., Nishimura, N., McLeod, C.W., 2002. Evaluation of the historical records of lead pollution in the annual growth rings and bark pockets of a 250-year-old *Quercus crispula* in Nikko, Japan. *The Science of the Total Environment* 295, 91-100.
- Bellis, D.J., Satake, K., Tsunoda, K., McLeod C., 2003. Environmental monitoring of historical change in arsenic deposition with tree bark pockets. *Journal of Environmental Monitoring* 5, 671-674.
- Bellis, D.J., Satake, K., McLeod, C., 2004. A comparison of lead isotope ratios in the bark pockets and annual rings of two beech trees collected in Derbyshire and SouthYorkshire, UK. *The Science of the Total Environment* 321, 105-113.

- Berg, T., Hjellbrekke, A., Rühling, A., Steinnes, E., 2003. Maps of the absolute deposition of heavy metals for the Nordic countries based on moss surveys. *Journal of Physiology. IV France* 107, 155-158.
- Berlizov, A.N., Blum, O.B., Filby, R.H., Malyuk, I.A., Tryshyn, V.V., 2007. Testing applicability of black poplar (*Populus nigra* L.) bark to heavy metal air pollution monitoring in urban and industrial regions. *The Science of the Total Environment* 372, 693-706.
- Bernard, S.M., Samet, J.M., Grambsch, A., Ebi, K.L., Romieu, I., 2001. The Potential Impacts of Climate Variability and Change on Air Pollution-Related Health Effects in the United States. *Environmental Health Perspectives* 109, 199-209.
- Bindler, R., Renberg, I., Klaminder, J., Emteryd, O., 2004. Tree rings as Pb pollution archives? A comparison of $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ isotope ratios in pine and other environmental media. *The Science of the Total Environment* 319, 173-183.
- Bliefert, C. and Perraud, R., 2001. *Chimie de l'environnement : eau, air, sol, déchets*. De Boeck Université, 477p.
- Böhm, P., Wolterbeek, H., Verburg, T., Musilek, L., 1998. The use of tree bark for environmental pollution monitoring in the Czech Republic. *Environmental Pollution* 102, 243-250.
- Bris, F.J., Garnaud, S., Apperry, N., Gonzalez, A., Mouchel, J.-M., Chebbo, G., Thévenot, D.R., 1999. A street deposit sampling method for metal and hydrocarbon contamination assessment. *The Science of the Total Environment* 235, 211-220.
- Carignan, J., Hild, P., Mevelle, G., Morel, J. and Yeghicheyan, D. 2001. Routine analyses of trace elements in geological samples using flow injection and low pressure on-line liquid chromatography coupled to ICP-MS: a study of reference materials BR, DR-N, UB-N, AN-G and GH. Geostandard Newsletter: *Journal of Geostandards and Geoanalysis* 25 (2-3), 187-198.
- Carreras, H.A. and Pignata, M.L., 2002. Biomonitoring of heavy metals and air quality in Cordoba City, Argentina, using transplanted lichens. *Environmental Pollution* 117, 77-87.
- Catinon, M., Ayrault, S., Daudin, L., Sevin, L., Asta, J., Tissut, M., Ravanel, P., 2008. Atmospheric inorganic contaminants and their distribution inside stem tissues of *Fraxinus excelsior* L. *Atmospheric Environment* 42, 1223-1238.

- Catinon, M., Ayrault, S., Clocchiatti, R., Boudouma, O., Asta, J., Tissut, M., Ravanel, P., 2009. The anthropogenic atmospheric elements fraction: a new interpretation of elemental deposits on tree barks. *Atmospheric Environment* 43, 1124-1130.
- Chambers, P.A., Vis, C., Brua, R.B., Guy, M., Culp J.M., Benoy, G.A., 2008. Eutrophication of agricultural streams: defining nutrient concentrations to protect ecological condition. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research* 58: 2203-10.
- Choi, S.D., Baek, S.Y., Chang, Y.S., Wania, F., Ikonou, M.G., Yoon, Y.J., Park, B.K., Hong, S., 2008. Passive air sampling of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides at the Korean arctic and Antarctic research stations: implications for long-range transport and local pollution. *Environmental Science and Technology* 42, 7125-7131.
- Chovin, P. et Roussel, A., 1968. *La pollution atmosphérique*. Presses universitaires de France, Paris, 128p.
- Cizdziel, J.V. and Hodge, V.F., 2000. Attics as archives for house infiltrating pollutants: trace elements and pesticides in attic dust and soil from southern Nevada and Utah. *Microchemical Journal* 64, 85-92.
- Colin, J.L., Losno, R., Leblond, S., Bon Guyen, E., 2004. Mesure des flux atmosphériques de métaux lourds sur un site de fond en France (Vouzon, Sologne). Rapport final du contrat ADEME n° 03 62 C0042/Air Créteil.
- Conti, M.E. and Cecchetti, G., 2001. Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment - a review. *Environmental Pollution* 114, 471-492.
- De Bruin, M. and Hackenitz, E., 1986. Trace Element Concentrations in Epiphytic Lichens and Bark Substrate. *Environmental Pollution (Serie B)* 11, 153-160.
- Daudin, L., Khodja, H. and Gallien, J.P. 2003. Development of “position-charge-time” tagged spectrometry for ion beam microanalysis. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 210, 153-158.
- Deluisa, A., Giandon, P., Aichner, M., Bortolami, P., Bruna, L., Lupetti, A., Nardelli, F., Stringari, G., 1996. Copper pollution in Italian vineyard soils. *Communications in soil science and plant analysis* 27, 1537-1548.
- Dimitriev, M.T., Bykhovskiy, M.Ia., Braude, A.Iu., 1983. Chromato-atomic absorption determination of toxic metallo-organic compounds in health studies. *Gigenia i sanitaria* 12, 43-46.

- Duffus, J.H., 2002. "Heavy metals"- a meaningless term? *Pure and Applied Chemistry* 74, 793-807.
- El-Hasan, T., Al-Omari, H., Jiries, A., Al-Nasir, F., 2002. Cypress tree (*Cupressus semervirens* L.) bark as an indicator for heavy metal pollution in the atmosphere of Amman City, Jordan. *Environment International* 28, 513-519.
- Ernst, W.H.O., Joosse van Damme, E.N.G., 1983. Umweltbelastung durch Mineralstoffe. Verlag Gustav Fischer, Stuttgart.
- Esser, B.K., and Turekian, K.K., 1993. The Osmium isotopic composition of the continental crust. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 57, 3093-3104.
- Farmer, A.M., Bates, J.W., Bell, J.N.B., 1991. Seasonal variations in acidic pollutant inputs and their effects on the chemistry of stemflow, bark and epiphyte tissues in three oak (*Quercus petraea*) woodlands in N.W. Britain. *New Phytologist* 118, 441-451.
- Farmer, A.M., 1993. The effects of dusts on vegetation - a review. *Environmental pollution* 79, 63-75.
- Forget, E., Courchesne, F., Kennedy, G., Zayed, J., 1994. Response of blue spruce (*Picea pungens*) to manganese pollution from MMT. *Water, Air and Soil Pollution* 73, 319-324.
- Freer-Smith, P.H., Beckett, K.P., Taylor, G., 2005. Deposition velocities to *Sorbus aria*, *Acer campestre*, *Populus deltoides*, *Pinus nigra* and *Cupressocyparis leylandii* for coarse, fine and ultra-fine particles in the urban environment. *Environmental Pollution* 133, 157-167.
- Freitas, M.C., Reis, M.A., Alves, L.C., Wolterbeek, H.T., 1999. Distribution in Portugal of some pollutants in the lichen *Parmelia sulcata*. *Environmental Pollution* 106, 229-235.
- Freitas, M.C., Reis, M.A., Marques, A.P., Wolterbeek, H.T., 2001. Use of lichen transplants in atmospheric deposition studies. *Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry* 249, 307-315.
- Freitas, M.C., Reis, M.A., Marques, A.P., Almeida, S.M., Farinha, N.M., de Oliveira, O., Ventura, M.G., Pacheco, A.M.G. and Barros, L.I.C. 2003. Monitoring of environmental contaminants: 10 years of application of k0-INAA. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 257(3), 621-25.
- Freitas, M. C., Pacheco, A. M. G., Vieira, B. J., Rodrigues, A. F., 2006a. Neutron activation analysis of atmospheric biomonitors from the Azores: A comparative study of lower and higher plants. *Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry* 270, 21-27.

- Freitas, M. C., Pacheco, A. M. G., Dionisio, I., Sarmiento, S., Baptista, M. S., Vasconcelos, M. T. S. D., Cabral, J. P., 2006b. Multianalytical determination of trace elements in atmospheric biomonitors by k(o)-INAA, ICP-MS and AAS. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A- Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment* 564, 733-742.
- Gabriel, I.E. and Patten, D.T., 1995. Establishing a standard Sonoran Reference Plant and its application in monitoring industrial and urban pollution throughout the Sonoran desert. *Water Air and Soil Pollution* 36, 27-43.
- Galsomies, L., Savanne, D., Letrouit, M.A., Ayrault, S., Charre, B., 1999. Retombées atmosphériques de métaux en France : estimation par dosage dans des mousses. Campagne 1996. *ADEME Editions*, France. 187p.
- Garrec, J.-P. et Van Haluwyn, C., 2002. Biosurveillance végétale de la qualité de l'air. Tec & Doc (Ed.) Paris, 116p.
- Garty, J., 2001. Biomonitoring atmospheric heavy metals with lichens: theory and application. *Critical Reviews in Plant Science* 20, 309-371.
- Gaudry, A., Moskura, M., Mariet, C., Ayrault, S., Denayer, F., Bernard, N., 2008. Inorganic Pollution in PM10 Particles Collected Over Three French Sites Under Various Influences: Rural Conditions, Traffic and Industry. *Water Air Soil Pollution* 193, 91-106.
- Gombert, S., Galsomies, L., Rausch de Traubenberg, C., 2005. Pollution atmosphérique par les métaux : biosurveillance des retombées. Les Ullis, Angers, EDP Sciences, ADEME, 108 p.
- Gonzalez, C.M. and Pignata, M.L., 1997. Chemical response of the lichen *Punctelia subrudecta* (NYL.) krog transplanted close to a power station in an urban-industrial environment. *Environmental Pollution* 97, 195-203.
- Govindaraju K., Potts, Ph., Webb J.S. and Watson J. 1994. 1994 report on Whin sill dolerite WS-E from England and Pitscurrie microgabbro PM-S from Scotland: assessment by one hundred and four international laboratories. *Geostandard Newsletter* 18, No 2, 211-300.
- Grantz, D.A., Garner, J.H.B., Johnson, D.W., 2003. Ecological effects of particulate matter. *Environment International* 29, 213-239.
- Grodzinska, K., 1971. Acidification of tree bark as a bioindicator of forest pollution in Southern Poland. *Water, Air and Soil Pollution* 8, 3-7.

- Grodzińska, K., 1982. Monitoring of air pollutants by mosses and tree bark. In: Steubing L & Jäger H-J (eds) Monitoring of air pollutants by plants. Dr. W. Junk Publishers, The Hague, p 33-42.
- Gustke, B., Symposium "Bioindikation – Ein wirksames Instrument der Umweltkontrolle", short Abstract, 24th-26th Sept. 1991, Vienna, VDI.
- Haapala, H. and Kikuchi, R., 2000. Biomonitoring of the distribution of dust emission by means of a new SEM/EDX technique. *Environmental Science Pollution Research* 7, 180-189.
- Hampp, R. and Höll, W., 1974. Radial and axial gradient of lead concentration in bark and xylem of hardwoods. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2, 143-151.
- Harju, L., Saarela, K.E., Heselius, S.J., Hernberg, F.J., Lindroos, A., 1997. Analysis of trace elements in trunk wood by thick-target PIXE using dry ashing for preconcentration. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 358, 523-528.
- Harju, L., Saarela, K.E., Rajander, J., Lill, J.-O., Lindroos, A., Heselius, S.J., 2002. Environmental monitoring of trace elements in bark of Scot pine by thick-target PIXE. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 189, 163-167.
- Harmens, H., Buse, A., Büker, P., Norris, D., Mills, G., Williams, B., Reynolds, B., Ashenden, T.W., Rühling, A., Steinnes, E., 2004. Heavy metal concentrations in European mosses: 2000/2001 survey. *Journal of Atmospheric Chemistry* 49, 425-436.
- Härtel, O., and Grill, D., 1972. Die Leitfähigkeit von Fichtenborken-Extrakten als empfindlicher Indikator für Luftverunreinigungen. *European Journal of Forest Pathology* 2, 205-215.
- Hattis, D., Russ, A., Goble, R., Banati, P., Chu M., 2001. Human interindividual variability in susceptibility to airborne particles. *Risk analysis: an official publication of the Society for Risk Analysis* 21, 585-99.
- Hauck, M., Jung, R., Runge, M., 2001. Relevance of element content of bark for the distribution of epiphytic lichens in a montane spruce forest affected by forest dieback. *Environmental Pollution* 112, 221-227.
- Hauck, M., Willenbruch, K., Leuschner, C., 2009. Lichen Substances Prevent Lichens from Nutrient Deficiency. *Journal of chemical ecology* 35, 71-73.
- Hawksworth, D.L. and Rose, F., 1970. Qualitative scale for estimating sulphur dioxide air pollution in England and Wales using epiphytic lichens. *Nature*. 227, 145-148.

- Hawksworth, DL., 1973. Mapping studies. In: BW. Ferry, MS. Baddeley and DL. Hawksworth (Eds.). *Air Pollution and Lichens*. Athlone Press, London, pp. 38-76.
- Heal, M.R., Hibbs, L.R., Agius, R.M., Beverland, I.J., 2005. Total and water-soluble trace metal content of urban background PM₁₀, PM_{2.5} and black smoke in Edinburgh, UK. *Atmospheric Environment* 39, 1417-1430.
- Heller, R., Esnault, R., Lance, C., 2004. Physiologie végétale. 6^{ème} édition, DUNOD, 324 pp.
- Heichel, G.H. and Hankin, L., 1972. Particles containing lead, chlorine and bromine detected on trees with an electron microprobe. *Environmental Science and Technology* 6, 1121-1128.
- Herman, F., 1992. Schwermetallgehalte von Fichtenborken als Indikator für antropogene Luftverunreinigungen. VDI-Berichte 902. In: *Bioindikation. Ein wirksames Instrument der Umweltkontrolle*. pp. 375-389. VDI Verlag, Düsseldorf.
- Hermle, S., Günthardt-Goerg, M.S., Schulin, R., 2006. Effects of metal-contaminated soil on the performance of young trees growing in model ecosystems under field conditions. *Environmental Pollution* 143, 703-714.
- Herzig, R., Liebendorfer, L., Urech, M., Ammann, K., 1989. Passive biomonitoring with lichens as a part of an integrated biological measuring system for monitoring air pollution in Switzerland. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 35, 43-57.
- Hodson, M.E., 2004. Heavy metals - geochemical bogey men? *Environmental Pollution* 129, 341-343.
- Huhn, G., Schulz, H., Stärk, H.J., Tölle, R., Schüürmann, G., 1995. Evaluation of regional heavy metal deposition by multivariate analysis of element contents in pine tree barks. *Water Air and Soil Pollution* 84, 376-383.
- Hutton, M., 1983. Sources of cadmium in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety* 7, 9-24.
- INRS, 2004. Bases de données : fiches toxicologiques de l'INRS. Rapport : //www.inrs.fr.
- Jeltes, R., 1969. Determination of bis(tributyltin)oxide in air by atomic absorption spectroscopy or pyrolysis gas chromatography. *The Annals of occupational hygiene* 12, 203-207.
- Jeran, Z., Jacimovic, R., Batic, F., Mavsar, R., 2002. Lichens as integrating air pollution monitors. *Environmental Pollution* 120, 107-113.
- Jochum, K.P., Hofmann, A.W., Seufert, H.M., 1993. Tin in mantle-derived rocks: constraints on Earth evolution. *Geochemecal and Cosmochimica Acta* 57, 3585-3595.

- Just, J., Maziarka, S., Wyszńska, H., 1968. Comparative studies on the atmospheric air dust pollution by aspiratory and sedimentation methods. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 19, 641-51.
- Kansanen, P. and Venetvaara, J., 1991. Comparison of biological collectors of airborne heavy metals near ferrochrome and steel works. *Water, Air, and Soil Pollution* 60, 337-359.
- Karandinos, H.G., Papakostidis, G.K., Fantinou, A.A., 1985. Heavy Metals in the Environment. In: Lekkas TD (ed). International Conference. Athens. CEP-Consultants LTD, Edinburgh, p 602-606.
- Kierdorf, H., Kierdorf, U., Sedlacek, F., 1999. Monitoring regional fluoride pollution in the Saxonian Ore mountains (Germany) using the biomarker dental fluorosis in roe deer (*Capreolus capreolus* L.). *The Science of the Total Environment* 232, 159-168.
- Kosmus, W. and Grill, D., 1986. Die Bedeutung verschiedener Parameter bei der Beurteilung von Immissionen anhand von Borkenanalysen am Beispiel des Stadtgebietes von Graz. *Mitteilungen des Naturwissenschaftlichen Vereines für Steiermark* 116, 161-172.
- Kreiner, W., 1986. Zur Analytik löslicher Komponenten der Borke nebst einem Vergleich des Verhaltens von Laub- und Nadelholzborke unter SO₂-Einwirkung. *Phyton* 26, 77-91.
- Kuik, P., and Wolterbeek, H.Th., 1994. Factors analysis of trace-element data from tree-bark samples in the Netherlands. *Environmental Monitoring and Assessment* 32, 207-226.
- Laaksovirta, K., Olkkonen, H., Alakuijala, P., 1976. Observations on the lead content of lichen and bark adjacent to a highway in Southern Finland. *Environmental Pollution* 11, 247-255.
- Leblanc, F., and De Sloover J., 1970. Relation between industrialization and the distribution and growth of epiphytic lichens and mosses in Montreal. *Canadian Journal of Botany* 48, 1485-1496.
- Lehndorff, E. and Schwark, L., 2008. Accumulation histories of major and trace elements on pine needles in the Cologne Conurbation as function of air quality. *Atmospheric Environment* 42, 833-845.
- Leifer, R.Z., Jacob, E.M., Marschke, S.F., and Praniti D.M., 2002. Atmospheric aerosol measurements of ²³⁸U and ²³²Th at Fernald, Ohio, and implications on inhalation dose calculations. *Health physics* 83, 892-900.
- Lewis, W.M., 1985. World health organization guidelines on organic micropollutants. *The Science of the Total Environment* 47, 83-91.

- Lin, C.C., Chen, S.-J., Huang, K.-L., 2005. Characteristics of metals in nano/ ultrafine/ fine/ coarse particules collected beside a heavily trafficked road. *Environmental Science and Technology*. 39, 8113-8122.
- Lindberg, S.E., 1989. Behavior of Cd, Mn and Pb in forest-canopy throughfall. In: Pacyna, J.M., ed. Control and fate of atmospheric trace metals. Kluwer academic Publishers, pp. 233-257.
- Lötschert, W. and Köhm, H.J., 1978. Characteristics of tree bark as an indicator in high immission areas. II. Contents of heavy metals. *Oecologia* 37, 121-132.
- Maatoug, M., Hellal, B., Dellal, A., Ayad, N., Bourbatach, M., 2007. Détection de la pollution de l'air d'origine routière par certaines espèces végétales bioaccumulatrices de quelques métaux lourds (Pb, Zn, Cu). *Pollution atmosphérique* 49, 385-394.
- Mandiwana, K.L., Resane, T., Panichev, N., Ngobeni, P., 2006. The application of tree bark as bio-indicator for the assessment of Cr (VI) in air pollution. *Journal of Hazardous Materials B* 137, 1241-1245.
- Marchionni, M., Benedetti, A., Riccardi, C., Villarini, M., 2000. Model for the study of the impact of atmospheric heavy metals on soil microbial biomass. *Annali di chimica* 90, 715-721.
- Markert, B., 1992. Establishing of "Reference Plant" for inorganic characterization of different plant species by chemical fingerprinting. *Water Air Soil Pollution* 64, 533-538.
- Markert, B. and Weckert, V., 1993. Time - and - site integrated long-term biomonitoring of chemicals by means of mosses. *Toxicological and Environmental Chemistry* 40, 43-56.
- Markert, B.A., Breure, A.M., Zechmeister, H.G., 2003. Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. In Markert, B.A., Breure, A.M., Zechmeister, H.G., (eds) *Bioindicators and biomonitors*. Elsevier, Oxford, p 3-39.
- Marlière, F., Bocquet, N., Rouez, M., 2002. Métaux - Mercure. INERIS. Rapport final. LCSQA. Convention 31/2001. Rapport, <http://www.lcsqa.org>.
- Martin, R.R., Naftel, S.J., Macfie, S.M., Jones, K.W., Feng, H., Trembley, C., 2006. High variability of the metal content of tree growth rings as measured by synchrotron micro x-ray fluorescence spectrometry. *X-Ray Spectrometry* 35, 57-62.
- Martin-Dupont, F., Gloaguen, V., Granet, R., Guilloton, M., Morvan, H., Krausz, P., 2002. Heavy metal adsorption by crude coniferous barks: a modelling study. *Journal of Environmental Science and Health. Part A*, 37, 1063-73.

- Martin-Dupont, F., Gloagen, V., Guilloton, M., Granet, R., Krausz, P., 2006. Study of the chemical interaction between barks and heavy metal cations in the sorption process. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 41, 1-12.
- Miquel, G., 2001. Rapport des effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Rapport Assemblée Nationale, Sénat. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, 363p.
- Mirlean, N., Roisenberg, A., Chies, J.O., 2007. Metal contamination of vineyard soils in wet subtropics (southern Brazil). *Environmental Pollution* 149, 10-17.
- Moriarty, F., 1999. Ecotoxicology - the study of pollutants in ecosystems. 3rd edition. Academic Press, San Diego, 347 p.
- Narewski, U., Werner, G., Schulz, H., Vogt, C., 2000. Application of laser ablation inductively coupled mass spectrometry (LA-ICP-MS) for the determination of major, minor, and trace elements in bark samples. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 366, 167-170.
- Neves, N.R., Oliva, M.A., da Cruz Centeno, D., Costa, A.C., Ribas, R.F., Pereira, E.G., 2009. Photosynthesis and oxidative stress in the restinga plant species *Eugenia uniflora* L. exposed to simulated acid rain and iron ore dust deposition: Potential use in environmental risk assessment. *The Science of the Total Environment* 407, 3740-3745.
- Niinemets, U., Loreto, F., Reichstein, M., 2004. Physiological and physicochemical controls on foliar volatile organic compound emissions. *Trends in Plant Science* 9, 180-186.
- Nimis, P.L., 1999. Linee-guida per la bioindicazione degli effetti dell'inquinamento tramite la biodiversità dei licheni epifiti. In *Atti del Workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria: stato dell'arte in Italia"*. pp. 267-277. Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente. Roma.
- Nriagu, J.O., 1989. A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature* 338, 47-49.
- Pacheco, A.M.G., Freitas, M.C., Barros, L.I.C., Figueira, R., 2001. Investigating tree bark as an air-pollution biomonitor by means of neutron activation analysis. *Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry* 249, 327-331.
- Pacheco, A.M.G., Barros, L.I.C., Freitas, M.C., Reis, M.A., Hipolito, C., Oliveira, O.R., 2002. An evaluation of olive-tree bark for the biological monitoring of airborne trace elements at ground level. *Environmental Pollution* 120, 79-86.

- Pacheco, A.M.G. and Freitas, M.C., 2004a. Are lower epiphytes really better than higherplants for indicating airborne contaminants? An insight into the elemental content of lichen thalli and tree bark by INAA. *Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry* 259, 27-33.
- Pacheco, A.M.G., Freitas, M.C., Ventura, M.G., 2004b. A nonparametric assesement of the relative output of INAA and PIXE on join determinants in Environmental samples (Atmospheric biomonitors). *Nuclear Instrument and Method in physics research B*. 222, 587-592.
- Pacyna, J.M., 1986. Atmospheric trace elements from natural and anthropogenic sources. In : Nriagu, J.O. and Davidson, C.I. (Eds) *Toxic metals in the atmosphere*, John Wiley and sons, New York, 33-52.
- Pacyna, J.M. and Pacyna, E.G., 2001. An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. *Environmental Reviews* 9, 269-298.
- Peters, J.M., Thomas, D., Falk, H., Oberdörster, G., Smith, T.J., 1986. Contribution of metals to respiratory cancer. *Environmental Health Perspectives* 70, 71-83.
- Piervittori, R. and Maffei, S., 2001. The importance of indicator species in the biomonitoring of atmospheric pollution. A case study in the city of Aosta, NW Italy. *Cryptogamie Mycologie* 22, 297-310.
- Pitcairn, C.E.R., Fowler, D., Grace, J., 1995. Deposition of fixed atmospheric nitrogen and foliar nitrogen content of bryophytes and *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *Environmental Pollution* 88, 193-205.
- Prance, C.T., Prance, A.E., Sandved, K.B., 1993. Bark. The formation, characteristics, and uses of bark around the world. *Timber Press*, Portland, 174 p.
- Pritchard, J.N., 1989. Dust overloading causes impairment of pulmonary clearance: evidence from rats and humans. *Experimental Pathology* 37, 39-42.
- Rabalais, N.N., 2002. Nitrogen in aquatic ecosystems. *Ambi* 31, 102-112.
- Rasmussen, L., 1978. Element content of epiphytic *Hypnum cupressiforme* related to element content of the bark of different species of phorophytes. *Lindbergia* 4, 209-218.
- Reimann, C. and De Caritat, P., 2000. Intrinsic flaws of elements enrichment factors (EFs) in environmental geochemistry. *Environmental Science and Technology* 34, 5084-91.

- Reimann, C. and de Caritat, P., 2005. Distinguishing between natural and antropogenic sources for elements in the environment: regional geochemical surveys versus enrichment factors. *Science of the Total Environment* 337, 91-107.
- Reimann, C., Ottesen, R.T., Andersson, M., Arnoldussen, A., Koller, F., Englmaier, P., 2008. Element levels in birch and spruce wood ashes - green energy? *Science of the Total Environment* 393, 191-197.
- Revel, G. Ayrault, S. 2000. Comparative use of INAA and ICP-MS methods for environmental studies. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 244 , 73-80.
- Rey-Asensio, A. and Carballeira, A., 2007. *Lolium perene* as a biomonitor of atmospheric levels of fluoride. *Environment International* 33, 583-588.
- Rühling, A., 1994. Atmospheric heavy metal deposition in Europe, estimations based on moss analysis. *Nord* 1994 9, 53p.
- Saarela, K.E., Harju, L., Lill, J.O., Rajander, J., Lindroos, A., Heselius, S.J., 2000. Thick-target PIGE analysis of plant materials preconcentrated by dry ashing. *Talanta* 51, 717-725
- Saarela, K.-E., Harju, L., Rajander, J., Lill, J.-O., Heselius, S.-J., Lindroos, A., Mattson, K., 2005. Elemental analysis of pine bark and wood in an environmental study. *The Science of the Total Environment* 342, 231-241.
- Saha, M.H., Sahaheen, N., Jaffar, M., 2006. Characterisation, source identification and apportionment of selected metals in TSP in an urban atmosphere. *Environmental monitoring and assessment* 114, 573-587.
- Saitanis, C.J. and Karandinos, M.G., 2001. Instrumental recording and biomonitoring of ambient ozone in the Greek countryside. *Chemosphere* 44, 813-821.
- Sanchez-Hernandez, J.C., 2000. Trace element contamination in Antarctic ecosystems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 166, 83-127.
- Satake, K., Tanaka, A., Kimura, K., 1996. Accumulation of lead in tree trunk bark pockets as pollution time capsulus. *The Science of the Total Environment* 181: 25-30.
- Schlipköter, H.W. and Beyen, K., 1986. Health effects of air pollutants. *Sozial und Präventivmedizin* 31, 3-8.
- Schubert, J., 1973. Heavy metals toxicity and environmental pollution. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 40, 239-297.

- Schulz, H., Huhn, G., Schüürmann, G., Niehus, B., Liebergeld, G., 1997. Determination of throughfall rates on the basis of pine bark loads: results of a pilot field study. *Journal of the Air & Waste Management Association* 47, 510-516.
- Schulz, H., Popp, P., Huhn, G., Stärk, H.-J., Schüürmann, G., 1999. Biomonitoring of airborne inorganic and organic pollutants by means of pine tree barks. I. Temporal and spatial variations. *The Science of the Total Environment* 232, 49-58.
- Schulz, H., Gehre, M., Hofmann, D., Jung, K., 2001. Nitrogen isotope ratios in pine bark as an indicator of N emissions from anthropogenic sources. *Environmental Monitoring and Assessment* 69, 283-297.
- Seaward MRD., 1989. Lichens as monitors of recent changes in air pollution. *Plants Today* 64-69.
- Shin, E.W., Karthikeyan, K.G., Tshabalala, M.A., 2007. Adsorption mechanism of cadmium on juniper bark and wood. *Bioresource Technology* 98, 588-594.
- Shotyk, W., Krachler, M., Chen, B., 2004. Antimony in recent, ombrotrophic peat from Switzerland and Scotland: Comparison with natural background values (5,320 to 8,020 C-14 yr BP) and implications for the global atmospheric Sb cycle. *Global Biogeochemical Cycles* 18, 1-13.
- Sirito de Vives, A.E., Moreira, S., Boscolo Brienza, S.M., Silva Medeiros, J.G., Tomazello Filho, M., Domingues Zucchi, O.L.A., do Nascimento Filho, V. F., 2006. Monitoring of the environmental pollution by trace element analysis in tree-rings using synchrotron radiation total reflection X-ray fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B* 61, 1170-1174.
- Srivastava, L.M., 1964. Anatomy, chemistry and physiology of bark. In: Romberger JA & Mikola P (eds) International review of forestry research. Vol. 1. Academic Press. New York & London.
- Stäxang, B., 1969. Acidification of bark of some deciduous trees. *Oikos*, 20, 224-230.
- Steinnes, E., 1995. A critical evaluation of the use of naturally growing moss to monitor the deposition of atmospheric metals. *The Science of the Total Environment* 160/161, 243-249.
- Suzuki, K., 2006. Characterisation of airborne particulates and associated trace metal deposited on tree bark by ICP-OES, ICP-MS, SEM-EDX and laser ablation ICP-MS. *Atmospheric Environment*. 40, 2626-2634.

- Świeboda, M. and Kalembe, A., 1979. The bark of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) as a biological indicator of atmospheric air pollution. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 48, 539-550.
- Symeonides, C., 1979. Tree-ring analysis for tracing the history of pollution: application to a study in northern Sweden. *Journal of Environmental Quality* 8, 482-486.
- Szopa, P.S., McGinnes, E.A., jr, Pierce, J.O., 1973. Distribution of lead within the xylem of trees exposed to airborne lead compounds. *Wood Science* 6, 72-77.
- Takala, K., Olkkonen, H., Krouse, H.R., 1991. Sulphur isotope composition of epiphytic and terricolous lichens and pine bark in Finland. *Environmental Pollution* 69, 337-348.
- Taylor, S.R., McLennan, S.M., 1985. The geochemical evolution of the continental crust. *Reviews of Geophysics* 33, 241- 65.
- Ternisien, J.A., 1968. Les pollutions et leurs effets, milieux inhalés, ingérés et acoustiques. Presses universitaires de France, 188 pp.
- Tilman, D., 1999. Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 5995-6000.
- Trass H., 1973. Lichen sensitivity to the air pollution and index of poleotolerance (IP). *Folia Cryptog Estonica Tartu* 3, 19-22.
- Trüby, P., 1988. Bleiverteilungen in Waldbäumen unterschiedlich belasteter Standorte. *Angewandte Botanik* 62, 93-104.
- Türkan, I., Henden, E., Celik, U., Kivilcim, S., 1995. Comparison of moss and bark samples as biomonitors of heavy metals in a highly industrialised area in Izmir, Turkey. *The Science of the Total Environment* 181, 25-30.
- Tye, A.M., Hodgkinson, E.S. and Rawlins, B.G., 2006. Microscopic and chemical studies of metal particulates in tree bark and attic dust: evidence for historical atmospheric smelter emissions, Humberside, UK. *Journal of Environmental Monitoring* 8, 904-912.
- Tyler, G. 1990. Bryophytes and heavy metals: a literature review. *Botanical Journal of the Linnean Society* 104, 231-253.
- Vallès, I., Camacho, A., Ortega, X., Serrano, I., Blàzquez, S., Pérez, S., 2009. Natural and anthropogenic radionuclides in airborne particulate samples collected in Barcelona (Spain). *Journal of Environmental Radioactivity* 100, 102-107.

- Van Dobben, H.F., and Ter Braak C.J.F., 1998. Effects of atmospheric NH₃ on epiphytic lichens in the Netherlands: the pitfalls of biological monitoring. *Atmospheric Environment*. 3, 551-557.
- Van Haluwyn C. et Lerond M., 1986. *Les lichens et la qualité de l'air. Evolution méthodologique et limites*. Ministère de l'Environnement. SRETIE.
- Walkenhorst, W., Hagemeyer, J. and Breckle, W., 1993. Passive monitoring of airborne pollutants, particularly trace metals, with tree bark. In *Plant as Biomonitors. Indicators for Heavy Metals in the Terrestrial Environment*. Ed. B.Markert. pp. 523-540. VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge.
- Ward, NI., Brooks, RR., Reeves, RD., 1974. Effect of lead from motor vehicle exhausts on trees along a major throughfare in Palmerston North, New Zealand. *Environmental Pollution* 6, 149-158.
- Weiss, D., Shotyk, W., Appleby, P.G., Kramers, I.D., Cheburkin, A.K., 1999. Atmospheric Pb deposition since the industrial revolution recorded by five Swiss peat profiles: Enrichment factors, fluxes, isotopic composition, and sources. *Environmental Science and Technology* 33, 1340-1352.
- Whelpdale, D.M., Summers, P.W., Sanhueza, E., 1998. A global overview of atmospheric acid deposition fluxes. *Environmental Monitoring and Assessment* 48, 217-247.
- Winner, W.E., 1988. Responses of bryophytes to air pollution . In T.H. Nash III, and V. Wirth, (Eds.). *Lichens, Bryophytes and Air Quality*.Cramer, Berlin.pp 141-173.
- Wirth V., 1988. Phytosociological approaches to air pollution monitoring with lichens. In Nash III TH. And Wirth, V.(Eds). *Lichens, Bryophytes and Air Quality*.Bibl. Lichenol. J. Cramer, 30, Berlin, Stuttgart, pp. 91-107.
- Wittig, R., 1993. General aspects of biomonitoring heavy metals by plants. In: Markert B (ed) *Plants as biomonitors - Indicators for heavy metals in the terrestrial environment*. VHC, Weinheim, p 3-27.
- Wolterbeek, H.Th., Kuik, P., Verburg, T.G., Warnelink, G.W.W., Dobben, H., 1996. Relations between sulphate, ammonia, nitrate, acidity and trace element concentrations in tree bark in the Netherlands. *Environmental Monitoring and Assessment* 40, 185-201.
- Wolterbeek, H.Th., Garty, J., Reis, M.A., Freitas, M.C., 2003. Biomonitors in use: lichens and metal air pollution. In Markert BA, Breure AM and Zechmeister HG (eds) *Bioindicators and biomonitors*. Elsevier, Oxford, p 377-419.

- Yue, W., Li, X., Liu, J., Li, Y., Yu, X., Deng, B., Wan, T., Zhang, G., Huang, Y., He, W., Hua, W., Shao, L., Li, W., Yang, S., 2006. Characterisation of PM_{2.5} in the ambient air of Shanghai city by analyzing individual particles. *The Science of the Total Environment* 368, 916 – 925.
- Zhang, C., Huang, B., Piper, J.D.A., Luo, R., 2008. Biomonitoring of atmospheric particulate matter using magnetic properties of *Salix matsudana* tree ring cores. *The Science of the Total Environment* 393, 177-190.